



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**TRANSPORTNÍ VLASTNOSTI HYDROGELOVÝCH
SYSTÉMŮ NA BÁZI DEXTRANU**

TRANSPORT PROPERTIES OF DEXTRAN-BASED HYDROGEL SYSTEMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

David Vyroubal

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1229/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **David Vyroubal**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Transportní vlastnosti hydrogelových systémů na bázi dextranu

Zadání bakalářské práce:

1. Seznámit se s problematikou hydrogelů a transportních procesů.
2. Prozkoumat možnosti studia transportu v hydrogelech.
3. Navrhnout a provést transportní experimenty v hydrogelech na bázi dextranu.
4. Zhodnocení výsledků a závěr.

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

David Vyroubal
student(ka)

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem transportních vlastností hydrogelových systému na bázi dextranu. Cílem práce je prozkoumat jejich schopnost absorbovat a uvolňovat navázanou látku. Jako sonda pro zkoumání transportních vlastností těchto systémů byla použita nilská červeň. Všechny hydrogely byly připravovány tzv. „mokrou cestou“, kdy se nejprve připraví zásobní roztoky dextranu a tenzidů a následně se smíchají za vzniku gelu. Nilská červeň byla vždy rozpuštěna v zásobním roztoku tenzidu a při smíchání se vytvářely zabarvené gely. Takto bylo vytvořeno několik typů gelů, které se lišily koncentrací použitého tenzidu a nilské červě. Supernatanty byly poté spektrofotometricky měřeny po různých časových intervalech. Pro prostudování transportních vlastností ve více prostředích byl původní supernatant po přípravě hydrogelů vyměněn za roztok tenzidu nebo za fyziologický roztok.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on study of transport properties of dextran-based hydrogel systems. The aim of this work is to determine their ability to absorb and release substances. Nile red was used as a probe to examine the transport properties of these systems. All hydrogels were prepared by the so-called wet way. At first stock solutions of dextran and surfactants were prepared and subsequently mixed to form a hydrogel. Nile red was dissolved in the surfactant stock solution and colored gels were formed upon mixing with dextran stock solution. Several types of gels were thus formed which differ in the concentration of the surfactant and nile red used. Supernatants were spectrophotometrically measured at various time intervals. For study of transport properties in multiple surroundings, the original supernatant was replaced after hydrogel preparation with a surfactant solution or physiological saline solution.

KLÍČOVÁ SLOVA

dextran, dodecylsírán sodný, SDS, nilská červeň, hydrogel, uvolňování, spektrofotometrie

KEYWORDS

dextran, sodium dodecyl sulfate, SDS, nile red, hydrogel, releasing, spectrophotometry

VYROUBAL, D. *Transportní vlastnosti hydrogelových systémů na bázi dextranu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 56 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce prof. Ing. Martině Klučákové, PhD. za její odborné vedení, ochotu a cenný čas. Dále bych chtěl poděkovat Ing. et Ing. Sabíně Jarábkové za její trpělivost, pomoc a čas, který mi věnovala při provedených experimentech. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své přítelkyni a celé rodině za jejich podporu nejen při studiu.

OBSAH

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | ÚVOD | 7 |
| 2. | TEORETICKÁ ČÁST..... | 8 |
| 2.1. | Využití biopolymerů ve farmacii a kosmetice..... | 8 |
| 2.1.1. | Chitin a chitosan..... | 10 |
| 2.1.2. | Celulóza..... | 11 |
| 2.1.3. | Kyselina hyaluronová..... | 12 |
| 2.1.4. | Alginát..... | 13 |
| 2.1.5. | Xantanová guma..... | 14 |
| 2.1.6. | Kolagen | 15 |
| 2.2. | Dextran | 15 |
| 2.2.1. | Struktura a vlastnosti dextranu | 16 |
| 2.2.2. | Výroba dextranu | 18 |
| 2.2.3. | DEAE-dextran | 19 |
| 2.2.4. | Využití dextranu | 20 |
| 2.3. | Využití hydrogelů ve farmacii a kosmetice | 20 |
| 2.3.1. | Hydrogely jako nosiče léčiv | 22 |
| 2.4. | Difuze | 24 |
| 2.4.1. | První Fickův zákon a difuzní koeficient | 24 |
| 2.4.2. | Druhý Fickův zákon | 25 |
| 3. | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 25 |
| 3.1.1. | Hydrogelové nosiče založené na dextranu | 25 |
| 3.1.2. | Použití SDS při přípravě gelů..... | 27 |
| 4. | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 28 |
| 4.1. | Použité látky | 28 |
| 4.2. | Použité přístroje a programy..... | 28 |
| 4.3. | Příprava hydrogelů | 28 |
| 4.3.1. | Příprava zásobních roztoků | 28 |
| 4.3.2. | Příprava kalibračních roztoků nilské červeně | 29 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.3.3. | Příprava hydrogelů | 29 |
| 4.4. | Provedené experimenty | 30 |
| 4.4.1. | Uvolňování sondy z gelu D1 a D2 | 30 |
| 4.4.2. | Uvolňování sondy z gelu D3 a D4. | 30 |
| 4.4.3. | Uvolňování sondy z plošného zdroje | 31 |
| 5. | VÝSLEDKY A DISKUZE | 32 |
| 5.1. | Dextran s 400 mM SDS (D1) | 32 |
| 5.1.1. | D1 s původním supernatantem..... | 33 |
| 5.1.2. | D1 s vyměněným supernatantem za SDS | 36 |
| 5.1.3. | D1 s vyměněným supernatantem za NaCl | 38 |
| 5.2. | Dextran se 100 mM SDS (D2) | 40 |
| 5.2.1. | D2 s původním supernatantem..... | 42 |
| 5.2.2. | D2 s vyměněným supernatantem za SDS | 44 |
| 5.2.3. | D2 s vyměněným supernatantem za NaCl | 46 |
| 6. | ZÁVĚR..... | 49 |
| 7. | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 51 |
| 8. | SEZNAM ZKRATEK A POUŽITÝCH SYMBOLŮ | 56 |
| 8.1. | Seznam zkratk..... | 56 |
| 8.2. | Seznam použitých symbolů | 56 |

1. ÚVOD

V současné době se mnoho vědeckých studií a týmů po celém světě zabývá využitím hydrogelů v nejrůznějších oblastech lidské činnosti. Důvodem využívání jsou jejich vlastnosti jako je schopnost absorbovat velké množství vody a nerozpustnost ve vodném prostředí. Při tvorbě hydrogelů je snaha používat biopolymery, které zajistí biokompatibilitu a biodegradabilitu těchto hydrogelů. Pro tyto výjimečné vlastnosti jsou používány v potravinářství, kosmetice, pro výrobu kontaktních čoček, v tkáňovém inženýrství, ve farmacii a dalších odvětvích. Stále častěji se hydrogely využívají v biomedicínských aplikacích a také jako krycí materiály při hojení ran. Stále větší pozornost se však hydrogelům věnuje při jejich využití jako nosičů léčiv nebo aktivních látek ve farmacii a kosmetice. Pro tyto potřeby je důležité znát jaké množství se dokáže navázat či uvolnit, s jakou rychlostí se navázaná látka uvolňuje, v jakém množství a po jakou dobu.

Cílem této práce je popsat transportní vlastnosti hydrogelových systémů na bázi dextran – SDS. Byly vytvořeny dva systémy, které se lišily koncentrací použitého SDS k zesíťování dextranu. K pozorování změn v těchto systémech byla použita jako sonda nilská červeně, která byla rozpuštěna v roztoku SDS a následně společně s ním začleněna do síťované struktury dextranového gelu. Uvolňování nilské červeně z gelu či její zakoncentrovávání v gelu bylo zkoumáno v několika různých prostředích. V prostředí původního supernatantu, nebo v prostředí kdy byl původní supernatant vyměněn za čisté SDS bez nilské červeně, anebo za roztok NaCl. Transportní vlastnosti byly charakterizovány měřením změn v absorbanci supernatantů pomocí spektrofotometrie a následně byly vztaženy na hmotnost a objem zkoumaných gelů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Využití biopolymerů ve farmacii a kosmetice

Polymery jsou molekuly skládající se z jednotlivých opakujících se jednotek, zvaných monomery, spojených kovalentní vazbou. Definitní počet monomerních jednotek není nijak určen a toto číslo zároveň charakterizuje polymerační stupeň [1]. Polymery mohou být obecně rozděleny na biodegradabilní a ty, které se biologicky nerozkládají. Další možné dělení do dvou skupin je podle způsobu jejich vzniku či získávání. Do jedné skupiny patří polymery produkované rostlinami, zvířaty a mikroorganismy. U těchto polymerů může být použita předpona bio- a mluvíme tedy o biopolymerech. Do druhé skupiny patří polymery získávané z fosilních paliv [2].

V posledních letech narůstá využití biopolymerů v souvislosti se zvyšujícím se zájmem o ochranu životního prostředí. Nevyužívají se jen biopolymery z obnovitelných zdrojů, ale velký nárůst zaznamenávají také syntetické polymery, které jsou však biodegradabilní, tedy v přírodě rozložitelné pomocí mikroorganismů. Ve farmacii, kosmetice, medicíně i potravinářství je o biopolymery zájem hlavně díky jejich biokompatibilitě, bioaktivitě či snadné odbouratelnosti v lidském organismu.

Tabulka 1: Příklad zařazení vybraných polymerů podle jejich původu a biologické rozložitelnosti či nerozložitelnosti [2].

| Původ | Biologicky rozložitelné | Nerozložitelné |
|-------------------|---|--|
| Přírodní | CA, CAB, CAP, CN, P3HB, PHBHV, PLA, škrob, chitosan | PE (LDPE), PA 11, PA 12, PET, PTT |
| Částečně přírodní | PBS, PBAT, směsi PLA, směsi škrobu | PBT, PET, PTT, PVC, SBR, ABS, PU, epoxidová pryskyřice |
| Z fosilních paliv | PBS, PBSA, PBSL, PBST, PCL, PGA, PTMAT, PVOH | PE (LDPE, HDPE), PP, PS, PVC, ABS, PBT, PET, PS, PA 6, PA 6.6, PU, epoxidová pryskyřice, syntetický kaučuk |

Legenda: ABS, akrylonitrilbutadienstyren; CA, acetátová celulóza; CAB, acetobutyráť celulózy; CAP, acetopropionát celulózy; CN, nitrát celulózy; HDPE, vysokohustotní polyethylen; LDPE, nízkohustotní polyethylen; P3HB, poly(3-hydroxybutyrát); PA 11, polyamid 11; PA 12, polyamid 12; PA 6, polyamid 6; PA 6.6, polyamid 6.6; PBAT, polyethylen adipát/tereftalát; PBS, polybutylen sukcinát; PBSA, polybutylen sukcinát/adipát; PBSL, polybutylen sukcinát/laktát; PBST, polybutylen sukcinát/tereftalát; PBT, polybutylen tereftalát; PCL, poly(ϵ -kaprolakton); PE, polyethylen; PET, polyethylentereftalát; PGA, polyglykolová kyselina; PHBHV, poly(3-hydroxybutyrát/3-

hydroxyvalerát); *PLA*, polymléčná kyselina; *PP*, polypropylen; *PS*, polystyren; *PTMAT*, poly(methylenadipát/tereftalát); *PTT*, polytrimethylen tereftalát; *PU*, polyuretan; *PVC*, polyvinylchlorid; *PVOH*, polyvinylalkohol; *SBR*, styren-butadienový kaučuk [2].

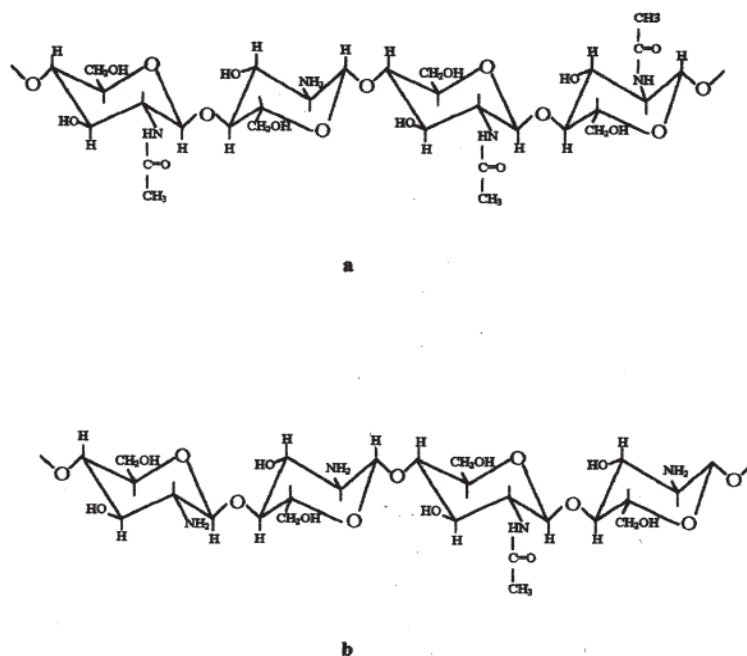
Obrovskou výhodou biopolymerů oproti ostatním materiálům využívaných v medicíně, farmacii či kosmetice je právě jejich biologický původ a s tím související řada dalších vlastností. Používání syntetických materiálů sebou může nést spoustu nevýhod jako je vyvolání imunitních reakcí, způsobení alergií a pomalé nebo neúplné odbourání z organismu. Právě degradační proces syntetických polymerů může vyvolávat nežádoucí imunitní reakce, kdy dochází k hydrolýze polymeru, při které se uvolňuje oxid uhličitý, jež snižuje lokální pH v buňce a způsobuje tkáňovou nekrózu. Z tohoto hlediska jsou biopolymery tou správnou volbou při využití v medicínských aplikacích, farmacii, kosmetice, jako obalové materiály potravin, potravinová aditiva, v oděvním průmyslu, při čištění odpadních vod, k výrobě průmyslových plastů, sorbentů a biosenzorů. V medicíně jsou konkrétně využívány jako dočasné protézy, 3D porézní struktury jako scaffoldy v tkáňovém inženýrství, jako kontrolovatelné/dlouhodobě působící nosiče léčiv a v neposlední řadě jako sutury pro fixaci a spojování orgánů [3].

Tabulka 2: Klasifikace biopolymerů [3].

| Klasifikace | Producent | Biopolymer |
|--------------------|----------------|---|
| Polysacharidy | Rostliny, řasy | Škrob, celulóza, agar, alginát, karagenan, pektin, konjac, různé gumy (např. guar) |
| | Zvířata | Chitin/chitosan, kyselina hyaluronová |
| | Bakterie | Xanthan, dextran, gellan, levan, kurdlan, polygalaktosamin |
| | Houby | Pullulan, elsinan, kvasinkové glukany |
| Proteiny | | Hedvábí, kolagen/želatina, elastin, resilin, polyamino kyseliny, sójový protein, zein, gluten, kasein, albumin |
| Polyestery | | Polyhydroxyalkanoáty (PHA), polymléčná kyselina (PLA) |
| Speciální polymery | | Šelak, polyglutamová kyselina, přírodní kaučuk, syntetické polymery z přírodních tuků a olejů, nylon z ricinového oleje |

2.1.1. Chitin a chitosan

Chitin je přírodní biopolymer získávaný z exoskeletu korýšů (např. z krabů a krevet) a také z buněčných stěn hub a hmyzu. Jedná se o lineární polysacharid složený z jednotek N-acetyl-D-glukosaminu spojených β -(1 \rightarrow 4) glykosidovou vazbou. Chitosan je derivát chitinu složený z jednotek D-glukosaminu vzniklých N-deacetylací chitinu v alkalickém prostředí. Název chitosan prakticky označuje skupinu N-deacetylovaných chitinů o různém stupni deacetylace. Obvykle se chitosan skládá asi z 80 % z D-glukosaminu a z 20 % z N-acetyl-D-glukosaminu. Molekulová hmotnost těchto polysacharidů může dosahovat až 10^6 Da. Stupeň acetylace a stupeň polymerace, který vlastně rozhoduje o molekulové hmotnosti, jsou dva důležité parametry rozhodující o využití chitinu a chitosanu pro nejrůznější aplikace. Tyto parametry rozhodují i o jejich viskozitě ve vodných roztocích, což velmi ovlivňuje jeho biochemické a biofarmakologické vlastnosti [4]. Chitin i chitosan jsou biokompatibilní, biodegradabilní, biologicky funkční, netoxické polymery s dobrými adsorpčními vlastnostmi a s modifikovatelnou molekulární strukturou, což je činní vhodnými pro využití v nejrůznějších biomedicínských aplikacích či kosmetických přípravcích a nejen tam. Velmi často se využívá i při čištění odpadních vod k odstranění kovových iontů. V zemědělství se využívá pro tvorbu růstových přípravků pro rostliny či jako hnojivo. Chitosan je navíc jedním z mála přírodních kladně nabitých polyelektrolytů [5].



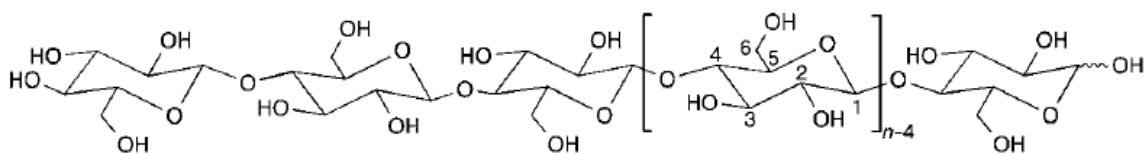
Obrázek 1: Struktura (a) chitinu a (b) chitosanu [4].

Za poslední dvě dekády se zájem o využití chitinu a chitosanu ve farmaceutickém průmyslu pro jeho biochemické vlastnosti značně zvýšil. Jeho polymerní kationtový charakter společně s potenciálně reaktivní funkční skupinou mu dávají unikátní vlastnosti pro použití jako kontrolovatelného nosiče léčiv. Léčivo je fyzikálně nebo kovalentně vázáno na aminoskupinu a při kontaktu s tělními tekutinami je z chitosanové matrice uvolňováno. Z chitosanu se vyrábějí umělé ledvinové membrány, které se vyznačují vysokou mechanickou pevností a propustností močoviny a kreatininu. Naopak nejsou propustné pro sérové proteiny a jsou unikátní tím, že na rozdíl od jiných náhrad membrán dokáží zadržet toxické kovy před proniknutím do krevního řečiště. N- a O-sulfonované chitosany vykazují podobné antikoagulační vlastnosti v rozmezí 15-45 % jako heparin. Při navázání uronových karboxylových skupin na sulfonovaný chitosan dochází ke zvýšení této antikoagulační aktivity. Takto modifikovaný chitosan je schopen agregovat leukemické buňky L-1210, takže růst a pohyb těchto buněk může být značně inhibován. Chitosan se osvědčil také při usnadnění hojení ran a jako hemostatikum [4].

V kosmetice se využívá depolymerizovaný chitosan a karboxymethylchitin jako aktivní složka šampónů, kondicionérů a ošetřujících přípravků na vlasy. Zde se využívá jeho viskozity ve vodných roztocích, kdy na povrchu vlasů vytvoří ochranný film zadržující vlhkost a dává tak vlasům a pokožce jemnost [4].

2.1.2. Celulóza

Celulóza je v přírodě velmi hojně rozšířená. Výroba jejích derivátů není nijak finančně nákladná což z celulózy dělá vhodný biopolymer pro široké spektrum nejrůznějších aplikací. Za posledních několik desetiletí se ukázalo, že celulóza může být také vyráběna pomocí bakterií. Tato bakteriální celulóza se vyznačuje unikátními fyzikálními a mechanickými vlastnostmi, vysokou čistotou a biokompatibilitou, které jí předurčují pro využití v biomedicínských či kosmetických odvětvích [6]. Celulóza je nerozvětvený polysacharid s chemickým vzorcem $(C_6H_{10}O_5)_n$. Skládá se z β -glukózových jednotek spojených β -(1→4) glykosidovou vazbou. Velké množství hydroxylových funkčních skupin je spojeno vodíkovými můstky a vytváří tak krystalickou strukturu. Celulózu jsou schopné produkovat bakterie rodu *Acetobacter*, některé řasy a řasovky neboli oomycety [5]. Nejvýznamnějším zdrojem celulózy jsou stromy, z nichž je většina celulózy použita pro výrobu papíru a lepenky. Asi pouhá 2 % z celkové výroby jsou použita pro tvorbu vláken a filmů, stejně tak pro výrobu množství etherů a esterů celulózy. Spousta aplikací využívá u celulózy její vlastnosti biokompatibilitu, chiralitu pro imobilizaci proteinů, protilátek, heparinu a pro separaci enantiomerů. Dále se využívá celá řada kompozitů celulózy se syntetickými polymery nebo biopolymery [7].

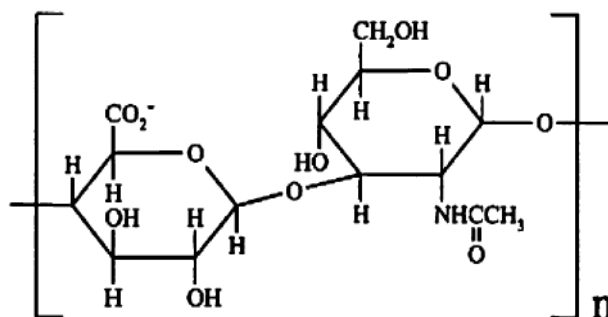


Obrázek 2: Molekulární struktura celulózy [7].

Z bakteriální celulózy se vyrábějí například náplasti. Tyto náplasti mají jednoduchou strukturu a dokáží velmi efektivně absorbovat hnis z rány a udrží se na nerovnoměrném povrchu. Tyto vlastnosti se uplatňují při léčení ran a popálenin. Dále se bakteriální celulóza široce uplatňuje při tvorbě náplastí s transdermálním přenosem léčiv [6]. Estery celulózy jsou používány jako nosiče léčiv. Tyto estery se vyznačují zanedbatelnou cytotoxicitou, dobrou stabilitou, vysokou propustností vody, schopností tvořit film a kompatibilitou s mnoha bioaktivními látkami. Acetát-ftalát celulózy (CAP) se využívá k enterickému potahování tablet, které umožňuje cílené uvolňování až ve střevě. Takto se potahují například tablety obsahující beklometason podávané pacientům, kteří podstoupili kolostomii (vývod tlustého střeva). U potažených tablet je obsah léčivých látek ve střevě až trojnásobný oproti nepotažovaným tabletám [5]. Celulóza se vyznačuje silnými zvlhčujícími účinky, které pomáhají zvýšit vlhkost pokožky. Díky těmto vlastnostem se přidává do kosmetických přípravků jako jsou plet'ové vody, krémy a masky [8].

2.1.3. Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (označovaná i jako hyaluronan, hyaluronan sodný, HA) je lineární polysacharid s vysokou molekulovou hmotností až 10^7 Da. Skládá se ze střídajících se jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu spojených β -(1 \rightarrow 4) a β -(1 \rightarrow 3) glykosidovými vazbami. Tvoří důležitou část synoviální tekutiny a extracelulární matrix. V lidském těle a u dalších obratlovců je všudypřítomná. Vyskytuje se i v kapsulách některých bakterií (např. kmen *Streptococcus*). Naopak chybí u hub, rostlin a hmyzu. Vzhledem ke své vysoké molekulové hmotnosti, unikátním viskoelastickým a reologickým vlastnostem a přírodnímu původu hraje HA velmi důležitou roli při využití v nejrůznějších aplikacích [9].



Obrázek 3: Struktura kyseliny hyaluronové [9].

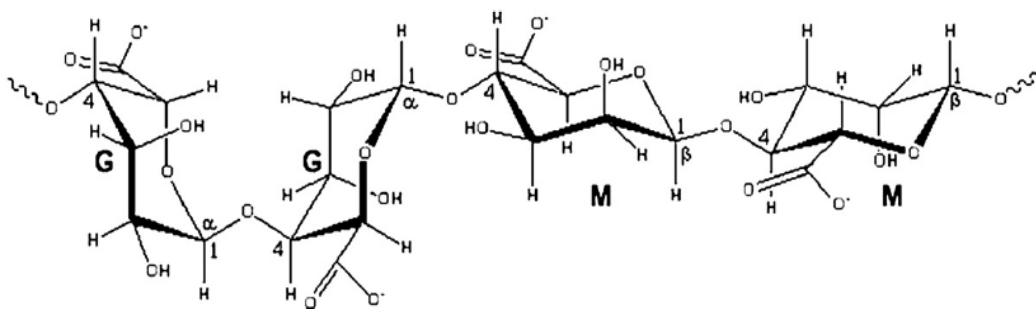
Kyselina hyaluronová je využívána v mnoha biomedicínských odvětvích a má silné zastoupení i v kosmetických přípravcích. Nejvíce využívaná je zejména v oftalmologii, jelikož sklivce oka je tvořen převážně právě kyselinou hyaluronovou. Používá se při operacích šedého zákalu a při implantaci čoček. Používá se i v ortopedii a revmatologii při operacích kloubů poškozených artritidou. V oblasti otorhinolaryngologie se využívá jejích osmotických, viskoelastických a vyplňovacích vlastností při léčbě nosních a krčních chorob a při léčbě hlasivek. Estery kyseliny hyaluronové slouží při léčbě ušních chorob. Tyto estery vytváří tenký film a napomáhají při hojení ušního bubínku, usnadňují obnovu ušního epitelu a zabráňují adhezi hlenu [9].

Lehce zesíťovaná HA je ve formě gelu využívána k vyplňování obličejových vrásek a propadlých jizev například po akné a je efektivnější než produkty založené na kolagenu. Na rozdíl od vyplňovačů vrásek na bázi kolagenu je HA velmi elastická a dokáže daleko lépe vrásky či jizvy vyplnit. Hyaluronanové hydrogely jsou používány pro zachycení DNA a jako nosiče léčiv. Léčivá látka může být navázána přímo na HA nebo je kyselina hyaluronová použita pro přípravu mikrokapsulí obsahujících léčivo. Hyaluronan může sloužit i pro zvýšení biokompatibility chitosanových mikrokapsulí k přenosu léčiv [9]. V kosmetických přípravcích, jako jsou nejrůznější krémy a masti, je kyselina hyaluronová používána jako nosič aktivních látek. Její přirozený výskyt v lidském těle jí umožňuje prostoupit horní vrstvou kůže (*stratum corneum*) a vzít s sebou aktivní látky. Této vlastnosti je využito například u léčby aktinické keratózy [10].

2.1.4. Alginát

Kyselina alginová, zvaná též jako alginát, je lineární biopolymer skládající se z jednotek kyseliny D-manuronové a kyseliny α -L-guluronové spojených (1 \rightarrow 4) glykosidickou vazbou. Kyselina alginová je získávána z hnědých mořských řas alkalickou extrakcí. Ve vodném roztoku tvoří vysoce viskózní gel [5].

Fyzikální vlastnosti alginátu umožňují jeho použití jako stabilizátor, gelační činidlo a prostředek pro zvýšení viskozity v potravinách, nápojích a v papírnickém a farmaceutickém průmyslu. Jeho všestrannost a biokompatibilita se rozvinula v oblastech medicíny, zubního lékařství a v biotechnologickém průmyslu. Používá se při výrobě obvazů k hojení ran, ve farmaceutických přípravcích proti pálení žáhy jako je Gaviscon a Asilon, dále pro enkapsulaci a kontrolovatelné uvolňování léčiv a enzymů nebo jako matrice v tkáňovém inženýrství. Alginátové soli se uplatňují v širokém spektru aplikací. Například alginát vápenatý je využíván při léčbě popálenin, pro imobilizaci buněk či pro enkapsulaci a odstranění některých znečišťujících látek. Nicméně alginát vápenatý není na rozdíl od alginátu sodného rozpustný ve vodě. Alginát sodný, nejčastější forma alginátu, je převážně používán v potravinářském průmyslu jako emulgátor a ve farmaceutickém průmyslu pro potahování tablet [11].



Obrázek 4: Struktura alginátu; (M) D-manuronová kyselina, (G) α -L-guluronová kyselina [5].

2.1.5. Xantanová guma

Xantanová guma je extracelulární, záporně nabitý exopolysacharid vylučovaný gram-negativními bakteriemi *Xanthomonas campestris*. Ty jej vyrábí fermentací glukózy a sacharózy. Primární řetězec se skládá z jednotek D-glukózy spojených β -(1 \rightarrow 4) vazbou. Vedlejší řetězce se skládají z β -D-manózy a β -D-glukuronové kyseliny, které jsou spolu spojeny β -(1 \rightarrow 4) a β -(1 \rightarrow 2) vazbami. Na hlavním i vedlejších řetězcích se nachází zbytky kyseliny pyrohroznové a O-acetylové skupiny, které z xantanové gumy dělají záporný polysacharid [11].

Vyznačuje se vysokou viskozitou a neneutronovskému chování roztoků, odolností ke změnám pH, výbornými reologickými vlastnostmi, odolností proti mechanické degradaci, stabilitou při vysokých teplotách, biodegradabilitou a přírodním původem. Tyto vlastnosti z ní činí velmi využívaný biopolymer se širokým uplatněním. Často je užívána v potravinářském a kosmetickém průmyslu, ale i v zemědělství a v petrochemickém průmyslu [11].

V kosmetice se xantan používá v prostředcích na čištění zubů a zubních protéz, v šampónech a v pleťových vodách. Využívají se jeho vlastnosti zahušťování a stabilizace emulzí [12]. Ve farmacii se navíc uplatňují i vlastnosti jako je tvorba filmu, želírování a samozřejmě biokompatibilita. Je používán v tekutých léčivých přípravcích i v přípravcích ve formě tablet, ve kterých napomáhá kontrolovanému uvolňování. Při cílené distribuci léčiv pomáhá stabilizovat nanočástice, lipozomy, niozomy, mikrosféry, hydrogely a dendrimery [11]

2.1.6. Kolagen

Kolagen je primární strukturní materiál obratlovců a v těle savců tvoří 20-30 % všech proteinů. Přibližně polovina celkového kolagenu v těle je obsažena v kůži. Je také důležitou součástí extracelulární matrix [13]. Základem kolagenního vlákna jsou 3 polypeptidové řetězce, které tvoří spirálu zvanou tropokolagen. Struktura tropokolagenu je stabilizována vodíkovými vazbami mezi jednotlivými polypeptidovými řetězci [5]. Pro medicínské využití je kolagen ideální volbou. Tělem je vstřebatelný a má velmi nízkou antigenicitu. Má velmi vysokou pevnost v tahu a vysokou afinitu vůči vodě. Dále je biokompatibilní a biodegradabilní. Vzhledem k tomu, že v těle funguje jako primární strukturní protein, je kolagen poměrně stabilní látkou [13].

Vrstvy kolagenu o šířce 0,01-0,5 mm mohou sloužit jako membrány či náplasti pro pozvolné uvolňování obsaženého léčiva. To může být do kolagenu začleněno pomocí vodíkových vazeb nebo kovalentní vazbou. Tyto membrány mohou být sterilizované a následně aplikované na místo potřeby [13].

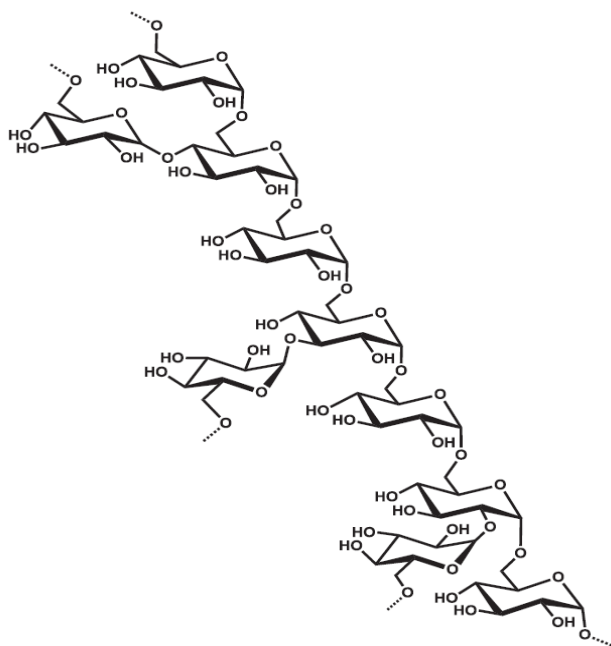
Kolagen je hojně využíván v kosmetice a jako doplněk stravy. Na trhu existuje celá řada doplňků stravy, které obsahují kolagen. Nejznámějšími přípravky jsou například Colafit nebo Kamzík od firmy Cemio. Dalšími výrobky jsou nejrůznější masti a balzámy posilující vlasy a ošetřující nehty.

2.2. Dextran

Dextran je dlouhou dobu znám jako problémový kontaminant potravinářských výrobků obsahujících cukr a nežádoucí látka při výrobě cukrů v cukrovarech. V roce 1861 prokázal Louis Pasteur, že dextran nacházející se ve víně vznikl mikrobiální aktivitou [14]. Název dextran a jeho empirický vzorec ($C_6H_{10}O_6$) byl poprvé použit německým chemikem Carlem Wilhelmem Bernhardem Scheiblerem v roce 1874, který se zabýval získáváním cukru z řepy. Konkrétně pozoroval vliv dextranu na houstnutí šťáv z cukrové třtiny a cukrové řepy. V těchto šťávách vznikl jako produkt fermentace bakterie *Leuconostoc mesenteroides* [15].

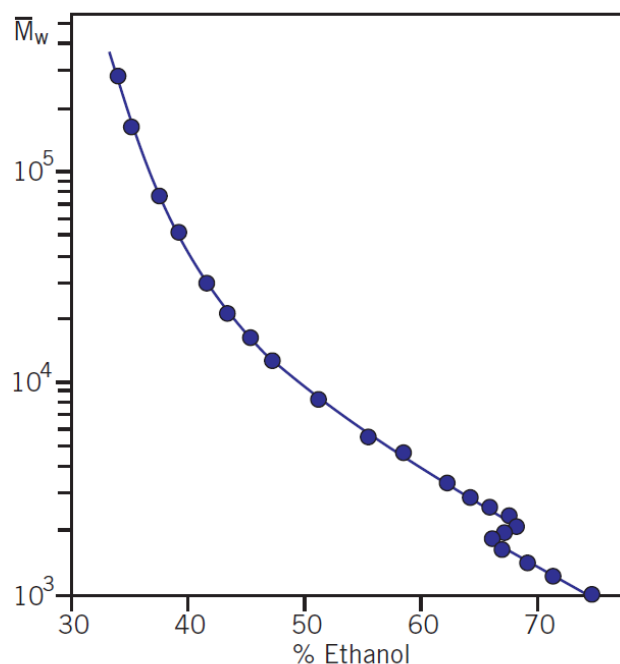
2.2.1. Struktura a vlastnosti dextranu

Dextran je neutrální homopolysacharid skládající se z jednotlivých monosacharidových jednotek D-glukózy spojených α -(1 \rightarrow 6) vazbami. Jedná se tedy o α -D-glukan. Tyto vazby mohou tvořit 50–97 % z celkového množství glykosidických vazeb dextranu v závislosti na způsobu vzniku. Zbytek vazeb tvoří postranní řetězce, které mohou být navázány α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) nebo α -(1 \rightarrow 4) vazbami. Molekulová hmotnost se tak díky četnosti postranních řetězců může pohybovat od 5 do 500 kDa [16].



Obrázek 5: Molekula dextranu se znázorněnými α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) a α -(1 \rightarrow 4) vazbami [16].

Vlastnosti dextranu se mohou podle jeho způsobu vzniku a rozdílnou strukturou molekuly lišit. Dextran může mít rozdílnou molekulovou hmotnost, boční řetězce mohou být navázány pod jinými úhly a jednotlivé typy glykosidických vazeb se mohou vyskytovat s různou četností. Dále se může lišit rozdílnou rozpustností a viskozitou. Většinou je rozpustný ve vodě, avšak některé typy dextranu se ve vodě nerozpouští, nebo se rozpouští velmi špatně a jejich rozpustnost se pohybuje okolo 30 mg/ml vody [16]. Je dobře rozpustný ve formamidu, dimethylsulfoxidu, ethylenglykolu a glycerolu, naopak není rozpustný v alkoholech a acetonu [17]. Ve směsi ethanolu a vody je jeho rozpustnost závislá na molekulové hmotnosti. Tuto závislost popisuje obrázek 6. Přírodní dextran vykazuje vysoký stupeň polydisperzity [15].



Obrázek 6: Závislost molekulové hmotnosti dextranu na jeho rozpustnosti ve směsi ethanol/voda, vyjádřeno v hmotnostních % [17].

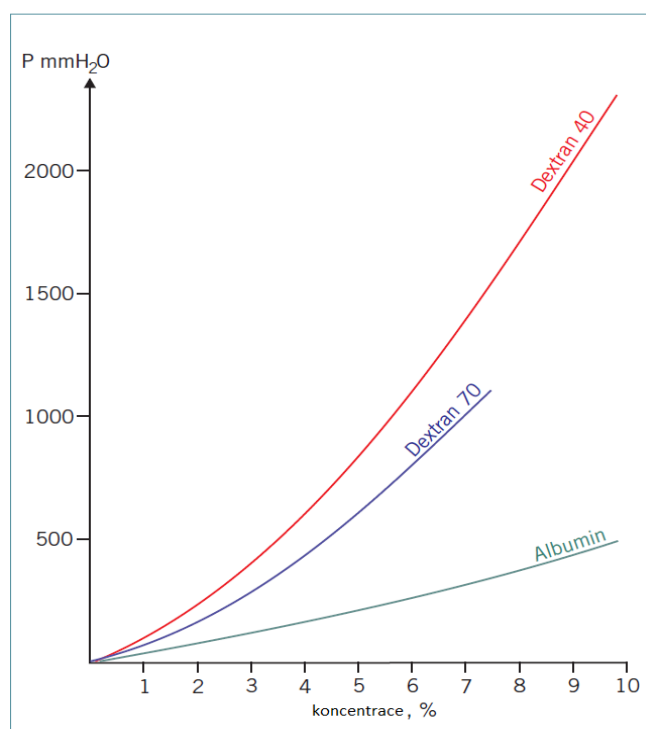
Dextran s molekulovou hmotností nad 2 000 v roztocích zaujímá tvar spirály. Tvar této spirály závisí na zvoleném rozpouštědle, molekulové hmotnosti dextranu a jeho koncentraci v roztoku. Se zvyšující se molekulovou hmotností narůstá i symetrie molekuly. Při molekulové hmotnosti pod 2 000 se spirálovitá struktura dextranu mění na lineární konformaci [17].

Dextran má výbornou stabilitu v roztoku. Prokázala to studie, při které byly sledovány roztoky s pH v rozmezí od 4,5 do 7. Tyto roztoky byly po sterilizaci uskladněny několik let při teplotách od 4 °C do 40 °C. Vzorky byly během uskladnění podrobeny 50 cyklům zmrazení/rozmrazení bez výrazných změn v molekulové hmotnosti nebo pH [17].

Reaktivitu dextranu umožňují hlavně sekundární, ekvatoriálně orientované, hydroxylové skupiny HO-2, HO-3 a HO-4. Malé procento (1,5 %) tvoří primární hydroxylové skupiny. Při nízkých molekulových hmotnostech je toto procento o něco vyšší díky neredukujícím koncovým skupinám. Při alkylaci dextranu vykazuje nejvyšší reaktivitu hydroxylová skupina HO-2. Tento jev je vysvětlován tím, že skupina HO-2 má oproti ostatním skupinám vyšší kyselost díky své blízkosti k anomernímu uhlíku. Stejný stupeň reaktivity vykazuje hydroxylová skupina HO-2 i při sulfonaci [17].

Při využívání dextranu jako náhrady krevní plazmy je velice důležitým faktorem, který je nutné znát, jeho osmotický tlak ve vodném roztoku. Ten byl zkoumán převážně u takzvaného

klinického dextranu, jehož molekulová hmotnost se pohybuje od 40 do 100 kDa. Dextran s vyššími molekulovými hmotnostmi, než je 100 kDa, je jako náhrada krevní plazmy méně vhodný pro jeho četnější větvení a tím i lehce změněné vlastnosti. Srovnání osmotického tlaku dextranu a albuminu, který tvoří 60 % všech plazmatických bílkovin, ukazuje následující obrázek 7. Rostoucí odchylka křivky dextranu od křivky albuminu při vyšších koncentracích v roztoku je způsobena vyšší interakcí dextranu s vodou než u albuminu [17].



Obrázek 7: Závislost osmotického tlaku v mmH₂O na koncentraci v roztoku v hmotnostních %. Dextran 40 označuje dextran o molekulové hmotnosti 40 kDa [17].

V lidském organismu je dextran odbouráván enzymaticky dextranázami, které se nacházejí v tlustém střevě, ve slezině, ledvinách a v plicích. Hlavním produktem biodegradace přírodního dextranu s molekulovou hmotností kolem 40 000 je izomaltóza. Schopnost degradace dextranu je velmi důležitá při používání farmaceutických a potravinových výrobků s obsahem dextranu. Při vysokém stupni substituce hydroxylových skupin se dextran stává enzymaticky neodbouratelný a jeho degradace závisí na síle vazby funkčních skupin. Estery dextranu jsou ve fyziologickém prostředí snadno hydrolyzovány a dále odbourávány [16].

2.2.2. Výroba dextranu

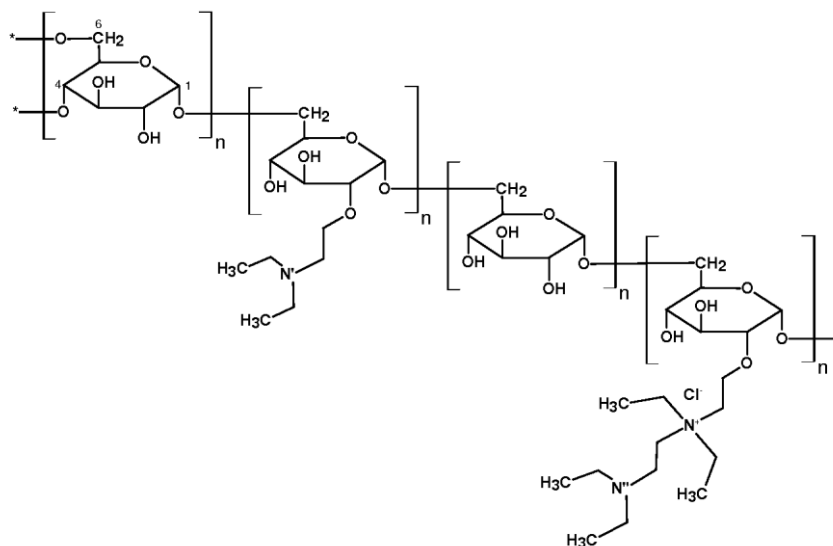
Dextran je produkován některými bakteriemi z řádu *Lactobacillales*, některými kmeny bakterií *Streptococcus* a produkuje jej i *Leuconostoc mesenteroides*. Některé druhy bakterií *Streptococcus* žijící v dutině ústní produkují dextran jako součást zubního plaku. Komerčně užívaný dextran je nejčastěji vyráběn kmenem bakterie *Leuconostoc mesenteroides*

označovaného jako NRRL B-512F. Struktura tohoto dextranu obsahuje jen asi 5% α -(1 \rightarrow 3) vazeb. Zatímco kmen *Leuconostoc citreum*, označovaný jako NRRL B-742, produkuje dvě různé struktury: jedna obsahuje asi 15% α -(1 \rightarrow 4) vazeb a druhá obsahuje 30-45% α -(1 \rightarrow 3) vazeb [14].

Při komerční výrobě *L. mesenteroides* vyžaduje pro tvorbu dextranu sacharózu jako prekurzor o 2% koncentraci, dále organický zdroj dusíku, růstové faktory, stopové množství minerálů a fosfát. Celý proces probíhá anaerobně při pH 6,7-7,2 a teplotě 25 °C. Dextran se z média získává srážením alkoholem a je přečišťován opakovaným srážením v alkoholu a rozpouštěním ve vodě. Buněčné zbytky jsou odstraňovány centrifugací [15].

2.2.3. DEAE-dextran

DEAE-dextran je vyráběn reakcí dextranu s N-(2-chlorethyl)-N,N-diethylamoniumchloridem v alkalickém prostředí. Vzniká tak polykation se třemi různými aminoskupinami. Z toho jsou 2 aminy terciární a 1 kvartérní. Terciární aminy mají hodnotu disociační konstanty pKa 9,2 a 5,5. Kvartérní aminoskupina má hodnotu pKa kolem čísla 14 a disociuje se při všech hodnotách pH. Při obsahu dusíku 3,2 % v molekule DEAE-dextranu vychází jedna nabitá aminoskupina na 3 glukózové jednotky. V roztoku při laboratorní teplotě a při pH v rozmezí od 4 do 14 je stabilní. Ve vysušené práškové formě má poměrně dobrou stabilitu při skladování v chladu [20].



Obrázek 8: DEAE-dextran se dvěma terciárními aminoskupinami a s jednou kvartérní aminoskupinou [19].

2.2.4. Využití dextranu

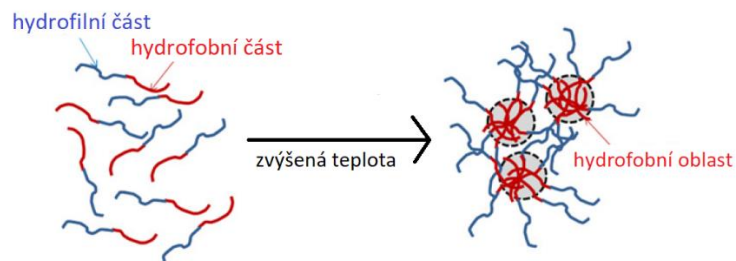
Dextran a jeho deriváty mají široké uplatnění. Přírodní dextran produkovaný bakterií *Leuconostoc mesenteroides* B-512F má nízkou antigenicitu, dobrou rozpustnost ve vodě a výbornou stabilitu v lidském krevním řečišti, a proto je vhodný pro využití v medicíně, farmacii a potravinářství. Klinický dextran s molekulovou hmotností 40 až 100 kDa je používán jako náhrada krevní plasmy při velkých ztrátách krve pro jeho schopnost zadržovat vodu a neprostupovat cévami stejně jako bílkoviny krevní plasmy. V krvi dokáže 1 g zadržet asi 20 ml vody. Dextran má také využití v mikrochirurgii pro jeho antitrombotický efekt. Dextran s navázaným železem se používá při akutní léčbě chudokrevnosti (anémie). Navíc některé přípravky dextranu s navázaným železem jsou používány pro zkvalitnění zobrazovacích technik při magnetické rezonanci. Síranové estery mají antikoagulační účinky podobné heparinu a působí jako silné inhibitory ribonukleáz. Síranové estery dextranu také vykazují účinky proti virům zvláště pak proti viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) a v Japonsku jsou používány při léčbě arteriosklerózy [18].

Merkaptodextran má vysokou afinitu vůči těžkým kovům jako je stříbro, rtuť, měď nebo zlato a díky jeho nízké toxicitě umožňuje využití při léčbě akutní otravy těžkými kovy a při čištění životního prostředí od těchto kovů. Pro jeho biokompatibilitu, hydratační schopnosti a vysokou stabilitu se používá v kosmetice a v nejrůznějších přípravcích pro péči o zrak a kůži [17]. V potravinářství se využívá jako pojivo a stabilizátor. Do cukrářských výrobků se přidává pro zadržení vlhkosti, zvýšení viskozity a inhibici krystalizace cukru. U gumových a želé bonbónů se přidává jako želírovací látka. V USA a Evropské unii však není dextran přímo povolen jako přídatná látka do potravin, ale jeho producent *Leuconostoc mesenteroides* je povolen a využívám při výrobě fermentovaných výrobků [18].

Nejvíce užívaný derivát dextranu je znám pod označením Sephadex® (název odvozen ze SEparation PHArmacia DEXtran). Sephadex je gel vzniklý reakcí alkalického roztoku dextranu s epichlorhydrinem. Tento gel je využíván jako molekulární síto pro purifikaci a separaci proteinů, nukleových kyselin a polysacharidů [17].

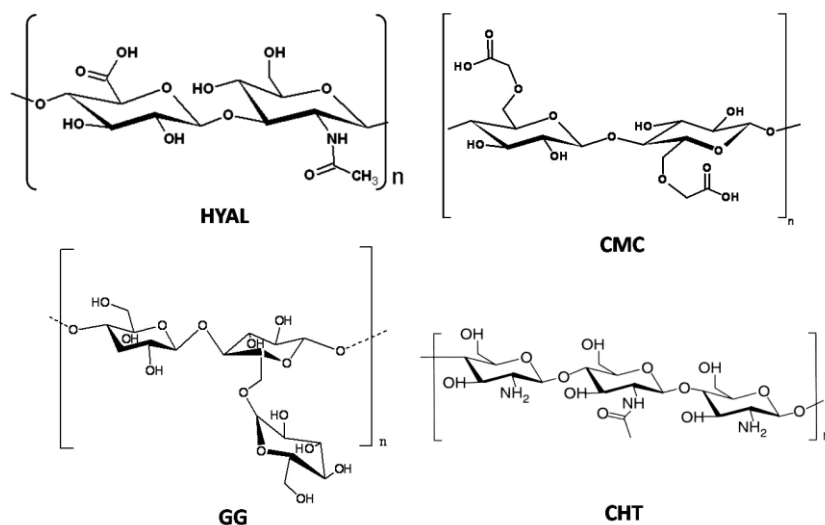
2.3. Využití hydrogelů ve farmacii a kosmetice

Hydrogely jsou trojrozměrné, hydrofilní, polymerní sítě schopné vstřebat velké množství vody nebo biologických tekutin. Hydrogely mohou být tvořeny homopolymery i kopolymery, které jsou díky chemickému či fyzikálnímu zesíťování odolné vůči rozpuštění ve vodném roztoku [21]. Podle typu vazeb v gelu je můžeme rozdělit na chemické a fyzikální. Proces tvorby gelu se nazývá gelace [22].



Obrázek 9: Mechanismus fyzikální gelace řízené hydrofobními interakcemi [23].

Nicméně v gelu se mohou vyskytovat i oba druhy vazeb. Ve srovnání se syntetickými biomateriály jsou hydrogely daleko více podobné extracelulární matrix, díky jejich struktuře a schopnosti vázat vodu, čímž se snižuje jejich potenciální riziko vyvolání imunitní reakce v organismu, což je předurčuje k využití v biomedicínských aplikacích [22]. Hydrogely mohou být vytvořeny prakticky z jakéhokoliv ve vodě rozpustného polymeru, díky čemuž mohou být vytvářeny nejrůznější chemické struktury s rozmanitými fyzikálními vlastnostmi [23].



Obrázek 10: Chemická struktura některých nejpoužívanějších polysacharidů k přípravě hydrogelů. HYAL: kyselina hyaluronová, CMC: karboxymethylcelulóza, GG: guma guar, CHT: chitosan [24].

Ve farmacii se hydrogely využívají jako cílené nosiče léčiv s kontrolovatelným uvolňováním. Gely na bázi PVA (polyvinylalkohol) slouží jako nosiče pro inzulin a při cílené distribuci do žaludku, jater, tenkého a tlustého střeva, nervového systému, mozku a při léčbě nádorů. Vyšším stupněm zesíťování PVA se docílí delší doby uvolňování. Dalšími využívanými hydrogely jsou diakryláty PEG (polyethylenglykol) a PCL (polykaproakton).

Vykazují negativní termosenzitivní chování vlivem hydrofilních a hydrofobních blokových kopolymerů, jsou biokompatibilní a biodegradabilní s dobou rozkladu od 3 do 8 měsíců. Kopolymery PHEMA a DMAEMA (polyhydroxyethylmetakrylát a dimethylaminoethylmetakrylát) slouží k přepravě inzulinu. Jsou citlivé na glukózu – přeměna na kyselinu glukonovou pomocí glukózooxidázy a zvýšení pH, které vede k botnění hydrogelu a uvolňování inzulinu z něj [25].

Neustálý vývoj aktivních složek a ingrediencí do kosmetických přípravků a produktů pro osobní péči se odráží i ve vývoji hydrogelů používaných v kosmetickém průmyslu. Příkladem nových nosičových materiálů v kosmetice je chitosonová kyselina (pod označením Chitosonic® Acid) a karboxymethyl-hexanoyl chitosan. Oba dva tyto produkty byly schváleny PCPC (Personal Care Products Council) a INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) jako nové přídavky do kosmetických produktů. Chitosonová kyselina je ve vodě rozpustný derivát chitosanu s vysokou hydrofilně-lipofilní rovnováhou (HLB). Při koncentraci vyšší, než je 0,5 % dokáže tvořit nano-síťovanou strukturu a při koncentraci pod 0,2 % se sama shlukuje do nanosférických struktur. Vykazuje i antimikrobiální aktivitu vůči gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím a proti houbám. V neposlední řadě se vyznačuje, tak jako ostatní hydrogely, vysokou schopností absorbovat a zadržet vodu a je kompatibilní s mnoha aktivními látkami užívaných v kosmetice [25]. Nejčastěji se v kosmetických přípravcích využívají hydrogely na bázi polysacharidů. Agar se do výrobků přidává pro udržení jednotlivých komponent pospolu, pro stabilizaci chemických vlastností a pro udržení dobrého stavu vlasů a ke zvlhčení pokožky. Soli alginátu pomáhají při hydrataci a zjemnění pokožky, vytváří film na povrchu pokožky a napomáhají stabilizovat olejovou fázi. Náplasti vytvořené z alginátu předcházejí vysušení rány a zanesení bakteriální infekcí. Pro zahuštění a zjemnění textury se využívají hydrogely na bázi celulózy. Válcový tvar cykloextrinů umožňuje pomalé uvolňování vůní. Glykogen v kosmetických přípravcích zvlhčuje kůži a snižuje buněčné stárnutí a degradaci. Do šampónů a zubních past se přidává guma guar, která způsobuje zahuštění a stabilizaci látek [26].

2.3.1. Hydrogely jako nosiče léčiv

Unikátní fyzikální vlastnosti hydrogelů jsou předmětem zájmu při jejich použití jako nosičů léčiv. Jejich vysoce porézní struktura může být lehce upravována změnou hustoty zesíťování. Právě jejich porozita umožňuje začlenění léčiva do gelové matrice a následné uvolňování v závislosti na difuzním koeficientu. Při návrhu hydrogelových nosičů se uplatňuje farmakokinetika – hydrogel je například navržen tak, aby se léčivo pomalu uvolňovalo a udržovalo si vysokou lokální koncentraci v okolních tkáních po delší dobu nebo může být navržen pro cílené doručení léčivého přípravku do konkrétní tkáně nebo orgánu. Dalším kritériem při návrhu nosiče je možnost jeho biodegradace například pomocí enzymů,

hydrolyzy, změnou pH a teploty. Biodegradace musí být uzpůsobena povaze obsaženého léčiva, tak aby k ní nedošlo ještě před dosažením cílového orgánu nebo před uvolněním veškerého obsahu. Hydrogely jsou poměrně dobře tvarovatelné a poddajné díky čemuž se mohou přizpůsobit povrchu, na který jsou aplikovány. Většina gelů má i dobré adhezivní vlastnosti a na místech potřebné aplikace (kůže, sliznice) se dokážou i ve vertikální pozici udržet [23].

I když hydrogely disponují celou škálou kladných vlastností, je jejich použití jako nosičů léčiv částečně omezené. Například nízká pevnost v tahu dokáže ovlivnit schopnost hydrogelu nést léčivo a může rozhodovat i o nechtěném předčasném rozpuštění hydrogelu nebo o jeho odplavení z místa cílené distribuce. Větší problém ale představuje vázání hydrofobních léčiv. Jejich množství a homogenita může být značně ovlivněna vysokým obsahem vody v hydrogelu. Tento vysoký obsah vody společně s velkou pórovitostí gelů může způsobit daleko rychlejší uvolňování léku, než je požadováno. Omezení může představovat i způsob aplikace gelu. Některé hydrogely jsou dostatečně deformovatelné, aby mohly být aplikovány injekčně, avšak většina takovým způsobem deformovatelná není (příliš viskózní), a tak jejich implantace vyžaduje například chirurgický zákrok [23].

Aby mohly být hydrogely využívány jako nosiče léčiv, musí se z nich léčivo uvolňovat. Hydrogely jsou navrhované tak, aby se léčivo začalo uvolňovat po stimulaci z okolního prostředí. Dokáží dramaticky změnit chování při botnání, síťovou strukturu a propustnost v závislosti na změně pH, iontové síly nebo teploty okolního prostředí. Některé hydrogely dokáží reagovat na změny po aplikování elektrického či magnetického pole nebo na změny v koncentraci glukózy [23].

U pH citlivých hydrogelů dochází při změně pH k dramatické změně stupně disociace označovaného jako pK_a či pK_b . Tato rychlá změna v náboji bočních skupin způsobí změnu objemu vlivem elektrostatických odpuzivých sil mezi ionizovanými skupinami, což vytvoří osmotický tok [25].

Teplotně citlivé hydrogely mají schopnost bobtnat a smršťovat se v závislosti na teplotě okolního prostředí. Rozlišují se na pozitivně a negativně teplotně citlivé. Parametrem pro pozitivní hydrogely je horní kritická teplota rozpustnosti (UCST). Pod touto teplotou se gely smršťují a uvolňují látky obsažené v matrici. Děje se tak vlivem vzniku vodíkových vazeb. Nad kritickou teplotou dochází k rozrušování vodíkových vazeb a hydrogely bobtnají. Negativně citlivé hydrogely jsou označovány dolní kritickou teplotou rozpustnosti (LCST). Při teplotě nad hodnotou dolní kritické rozpustnosti dochází ke smršťování hydrogelu a pod touto hodnotou bobtnají [25].

V současné době jsou ve vývoji hydrogely citlivé na obsah glukózy pro zacílení uvolňování inzulinu při léčbě diabetu. Lokální pH systému se vlivem oxidace glukózy na glukonovou kyselinu za přítomnosti glukózooxidázy sníží a dochází k bobtnání hydrogelu a uvolňování inzulinu. Pro snížení rychlosti difuze a snadnější kontrolu uvolňovaného inzulinu se glukózooxidáza kovalentně váže do hydrogelového systému [25].

2.4. Difuze

Difuze je proces, při kterém v koncentračně nehomogenním systému dochází k samovolnému vyrovnávání koncentrace. Jednotlivé částice mají obecně snahu přecházet z prostředí se svojí vyšší koncentrací do prostředí s nižší koncentrací. Tyto pohyby způsobují nerovnoměrně rozložené chemické potenciály a celý systém má snahu vyrovnat termodynamické rovnováhy. Změny v těchto systémech popisují Fickovy zákony [27].

Široká škála dostupných biopolymerů (jako například kyselina hyaluronová, dextran) a jejich kombinace s nejrůznějšími léčivy umožňuje jejich využití jako kontrolovatelnou difúzní bariéru. Vlastnosti a stavba této difúzní bariéry závisí na požadovaném uvolňování léčivé látky. Těmito požadavky jsou například postupné uvolňování látky nebo uvolňování jen v místě určení. Difúze je tedy ovlivněna strukturou polymeru a jeho interakcí s biologickými tekutinami. Právě znalost rychlosti difúze léku z těchto systémů polymer-léčivo nám umožňuje stanovit dobu uvolnění tohoto léčiva. Pokud tedy známe difúzní vlastnosti, můžeme uvolňování léčivých látek optimalizovat změnou počátečních vlastností biopolymeru [28].

2.4.1. První Fickův zákon a difúzní koeficient

Difúzní koeficient neboli koeficient úměrnosti je základním parametrem pro hodnocení všech difúzních procesů a charakterizuje míru mobility v dané látce. Pohyb molekul se děje směrem klesající koncentrace a závisí na koncentračním gradientu v daném místě a daném čase. Tato závislost je dána prvním Fickovým zákonem:

$$J_i = -D_i \frac{\partial c_i}{\partial y} \quad (1)$$

J_i je difúzní tok, c_i koncentrace složky a D_i je difúzní koeficient. Symbol parciální derivace znamená, že veličiny jsou také funkcí teploty, tlaku a času. Při stacionární difúzi je koncentrační gradient $\partial c_i / \partial y$ konstantní. Příkladem uspořádání při měření stacionární difúze je difúzní cela, na jejímž dolním konci je udržována konstantní koncentrace sycením roztoku rozpouštěním tuhé fáze a na horním konci je udržována nulová koncentrace omýváním pomalým proudem čistého rozpouštědla [29]. Difúzní koeficient udává počet molů dané

složky směsi, jež projde jednotkovou plochou za jednotku času při jednotkovém spádu koncentrace složky. Hlavní jednotkou difuzního koeficientu je m^2/s [27]

2.4.2. Druhý Fickův zákon

Jestliže se koncentrační gradient mění s časem, mluvíme o nestacionární difuzi. Řešením následující rovnice při zadaných počátečních a okrajových podmínkách lze určit koncentraci látky v závislosti na čase a poloze. Rychlost změny koncentrace v určitém místě systému v tomto případě popisuje druhý Fickův zákon:

$$\frac{\partial c_i}{\partial \tau} = D_i \frac{\partial^2 c_i}{\partial y^2} \quad (2)$$

Druhý Fickův zákon je diferenciální rovnice druhého řádu vzhledem k prostorové souřadnici a prvního řádu vzhledem k času. Jejím řešením dostaneme koncentraci jako funkci místa a času [27,29].

Při výpočtech difuzních koeficientů v gelu (D_g) z koncentrace rozpuštěné látky měnícím se v čase a jejím toku v závislosti na čase, byla použita následující rovnice:

$$m = \frac{2\varepsilon c_0}{1 + \varepsilon \sqrt{D_g/D}} \sqrt{\frac{D_g t}{\pi}} \quad (3)$$

V této rovnici m představuje tok difundující látky udávané v mol/m^2 a ε je poměr koncentrace sondy v gelu a v roztoku po ustavení rovnováhy, a tedy po ukončení difuze. Počáteční koncentrace rozpuštěné látky je vyjádřena hodnotou c_0 a D je difuzní koeficient rozpuštěné látky (sondy) v roztoku [30].

3.SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1.1. Hydrogelové nosiče založené na dextranu

Standartní klinická léčba rakoviny prsu zahrnuje lumpektomii následovanou lokální radioterapií nebo chemoterapií. Tyto metody mají za následek ztrátu zdravých tkání a nežádoucí vedlejší účinky. Buňky MDA-MB-231 způsobující rakovinu dokáže úspěšně eliminovat lék doxorubicin s nízkou cytotoxicitou vůči NIH 3T3 fibroblastům. Je však potřeba působit nízkou dávkou a po delší dobu. **Niu a kol.** vyvinuli pro tuto metodu léčby nosičový systém založený na dextran sulfátu. Ke komplexu byly přidány dvojvalné kovy ve sloučeninách CaCl_2 nebo MgCl_2 , které zlepšují zadržení a prodlužují uvolňování doxorubicinu. Celý komplex DS-DOX spolu s kovovými ionty následně enkapsulovaly do biokompatibilního, biodegradabilního a injektovatelného agarosového hydrogelu. Pomocí

koncentrace Ca^{2+} a Mg^{2+} je možné ovlivňovat dobu, po kterou se doxorubicin bude z komplexu uvolňovat [31].

Jalalvandi a kol. se zabývali vytvořením pH senzitivního hydrogelu pro uvolňování navázaného 5-fluorouracilu, hydrofilního protirakovinného léčiva. Oxidací dextranu vytvořili dextranaldehyd (DA), který smíchali s polyhadrazidem (PHZ). Směs těchto polymerů nechali reagovat se Schiffovými bázemi pro vytvoření hydrazonové vazby k zesílení. Takto vytvořený gel nevykazoval žádnou toxicitu vůči myším fibroblastům. Do tohoto hydrogelu následně enkapsulovali 5-fluorouracil. Doba uvolňování léčiva byla regulována stupněm zesíťování. Hydrogely s vysokým stupněm zesíťování vykazovaly delší dobu degradace, nižší úroveň botnání a delší dobu uvolňování. Hodnota pH měla také vliv na uvolňování. Při nižším pH (okolo 6,4) se 5-fluorouracil uvolňoval rychleji. Tyto časy uvolňování se pohybovaly od 35 do 42 hodin [32].

Časté využití hydrogelů založených na dextranu je při vytváření náplastí a obvazů pro hojení ran. U hojení ran jsou vyžadovány od materiálu antimikrobiální vlastnosti pro předcházení zanícení rány infekcí. Tímto materiálem se zabýval **Wang a kol.** Vytvořil dvoufunkční a biodegradabilní dextran-polyethylenglykolový hydrogel s kovalentně navázanými antibakteriálními látkami Polymyxinen B a Vancomycinem (Vanco). Hydrogel je přizpůsoben k použití jako specializovaný obvaz na rány, který vyhubí stávající bakterie, zabráni růstu nových, zvyšuje účinek antibiotik a urychluje růst nových tkání. Hydrogel vykazuje antibakteriální aktivitu vůči gram-negativním bakteriím *Escherichia coli* i proti gram-pozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus*. Antibiotika se z gelu uvolňovala ve stejném množství po dobu 2 týdnů a po 17 dnech došlo ke kompletní degradaci hydrogelu [33].

Na použití dextranových hydrogelů jako nosič biocidních přípravků pracoval i **Hoque a kol.** Ti se snažili vytvořit systém, který by byl schopný nést nízkomolekulární biocidní látky schopné ničit biofilm a zabráňovat jeho tvorbě. K tomuto účelu využili dextran metakrylát, který je biokompatibilní a fotopolymerizovatelný. Při fotopolymerizaci k němu přidali kladně nabitý biocidní přípravek se dvěma kladnými náboji, dvěma amidovými vazbami a optimální amfifilitou. Takto připravené gely mají přesně dané množství biocidního přípravku a vykazují 100% účinnost proti meticilin-rezistentním bakteriím *Staphylococcus aureus* (MRSA). Gely dokážou biocidní přípravek uvolňovat až po dobu 5 dnů a jsou schopné kompletně zničit biofilm vytvořený bakteriemi *S. aureus*, *Escherichia coli* i MRSA [34].

Fyzikálně a chemicky zesíťované hydrogely založené na chitosanu a dextran sulfátu byly navrženy jako nosiče probiotických látek. Tyto nosiče zkoumal **Falco a kol.** Botnání těchto hydrogelů je založeno na jejich složení (poměr chitosanu a dextran sulfátu) a je slabě ovlivněno pH. Fyzikálně zesíťované hydrogely vytvořili smícháním zásobních roztoků

chitosanu a dextran sulfátu, chemické byly zesíťované genipinem. Následně byly do gelů vloženy probiotické bakterie *Lactobacillus acidophilus* [35].

3.1.2. Použití SDS při přípravě gelů

Li a kol. se zabývali nosiči léčiv proteinové/peptidové povahy, které by byly schopné zajistit enzymatickou stabilitu a vysokou účinnost při orálním podání. Základ těchto nosičů založili na dodecylsulfátu sodném (SDS) a β -cyklodextrinu (β -CD) zakotvených v chitosanovém gelu. Jako modelové léčivo využili inzulin. Vytvořené SDS/ β -CD vezikuly byly charakterizovány velikostí částic, zeta potenciálem, vzhledem, mikroskopickou morfologií a schopností zachytit léčivo. Dále zkoumali interakce inzulin-vezikuly a stabilitu inzulinu ve vezikulách za přítomnosti pepsinu. Inzulin zakotvený v nosičovém systému vezikuly-chitosan vykazoval pH-selektivní uvolňování – pomalé uvolňování v acidickém roztoku a poměrně rychlé uvolňování v neutrálních roztocích [36].

Velký potenciál mají v současnosti díky nízké invazivnosti během aplikace in situ formované fibroinové hydrogely. U těchto biomateriálů je požadována velice rychlá gelace za fyziologických podmínek ihned po aplikování injekce. **Wu a kol.** využili k urychlení gelace fibroinu aniontový tensid – SDS. Při nízkých koncentracích tenzidu hrály hlavní roli v urychlení gelace vodíkové vazby mezi jednotlivými řetězci fibroinu. Při vysokých koncentracích tenzidu však docházelo k tvorbě elektrostatických odpudivých sil mezi micelárními agregáty což vedlo k potlačení gelace. Pro experimenty používali 4% roztok fibroinu, který byl smíchán s roztoky SDS o koncentracích 1-33 mM. Nejrychlejší gelace probíhala v rozmezí koncentrací 8-12 mM [37].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité látky

DEAE-dextran hydrochlorid

CAS: 9064-91-9, Sigma-Aldrich s.r.o., $M_w = 500$ kDa, čistota $\geq 97,5$ %

SDS, dodecylsírán sodný

CAS: 151-21-3, Sigma-Aldrich s.r.o., $M_w = 288,38$ g/mol, čistota $\geq 98,5$ %

STS, tetradecylsírán sodný

CAS: 1191-50-0, Sigma-Aldrich s.r.o., $M_w = 316,43$ g/mol, čistota ≥ 95 %

Nilská červeně

CAS: 7385-67-3, Sigma Aldrich s.r.o., čistota $\geq 98,0$ %, $\lambda_{\max} = 553$ nm

Chlorid sodný

NaCl, CAS: 7647-14-5; Penta s.r.o., č. šarže: 1903200314, čistota $\geq 99,9$ %

Deionizovaná voda

H₂O, Purelab: ELGA

4.2. Použité přístroje a programy

Měření absorbancí roztoků bylo prováděno na dvoupaprskovém UV-VIS spektrofotometru Hitachi U-3900. Pro měření byly použity křemenné kyvety s optickou délkou 1 cm. Nejdříve byly změřeny absorbance kalibračních roztoků při absorpčním maximu nilské červeně, tedy při 553 nm. Z kalibračních roztoků byla vytvořena kalibrační přímka. Poté byly další naměřené absorbance v supernatantech přepočítávány na koncentraci pomocí Lambert-Beerova zákona. Všechna data byla vyhodnocována pomocí programu Microsoft Word Excel.

4.3. Příprava hydrogelů

4.3.1. Příprava zásobních roztoků

Veškeré zásobní roztoky DEAE-dextranu, SDS a STS byly připravovány v 0,15 M NaCl, který byl připraven rozpuštěním 8,766 g NaCl v 1 000 ml deionizované vody. Pro přípravu všech hydrogelů byl vždy používán zásobní roztok DEAE-dextranu o koncentraci 4 hm. %. Ten byl připravován rozpuštěním 4 g DEAE-dextranu ve 100 ml 0,15M NaCl. Dále byly připraveny zásobní roztoky SDS o koncentraci 400 mM a 100 mM a STS o koncentraci 200 mM a 150 mM. Roztoky tenzidů byly připraveny rozpuštěním takového množství SDS či

STS v 0,15 M NaCl tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace zásobního roztoku. Po odměření přesného objemu a navážení požadovaného množství byly roztoky SDS i dextranu nechány přes noc na třepačce pro úplnou homogenizaci směsi. Roztoky STS musely být pro rozpuštění umístěny na třepačku v sušárně při 50 °C.

K obarvení zásobních roztoků tenzidů byl použit zásobní roztok nilské červeně (NR) o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ M rozpuštěné v acetonu. Požadované množství nilské červeně v acetonu bylo napipetováno do čistých vialek a aceton se nechal volně odpařit. Následně byla zbylá nilská červeně ve vialce zalita potřebným množstvím roztoku tenzidu a ponechána na třepačce do dalšího dne pro zhomogenizování směsi. Takto bylo připraveno 10 různých roztoků nilské červeně v SDS s koncentracemi 2; 3,5; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 a 15 μ M.

4.3.2. Příprava kalibračních roztoků nilské červeně

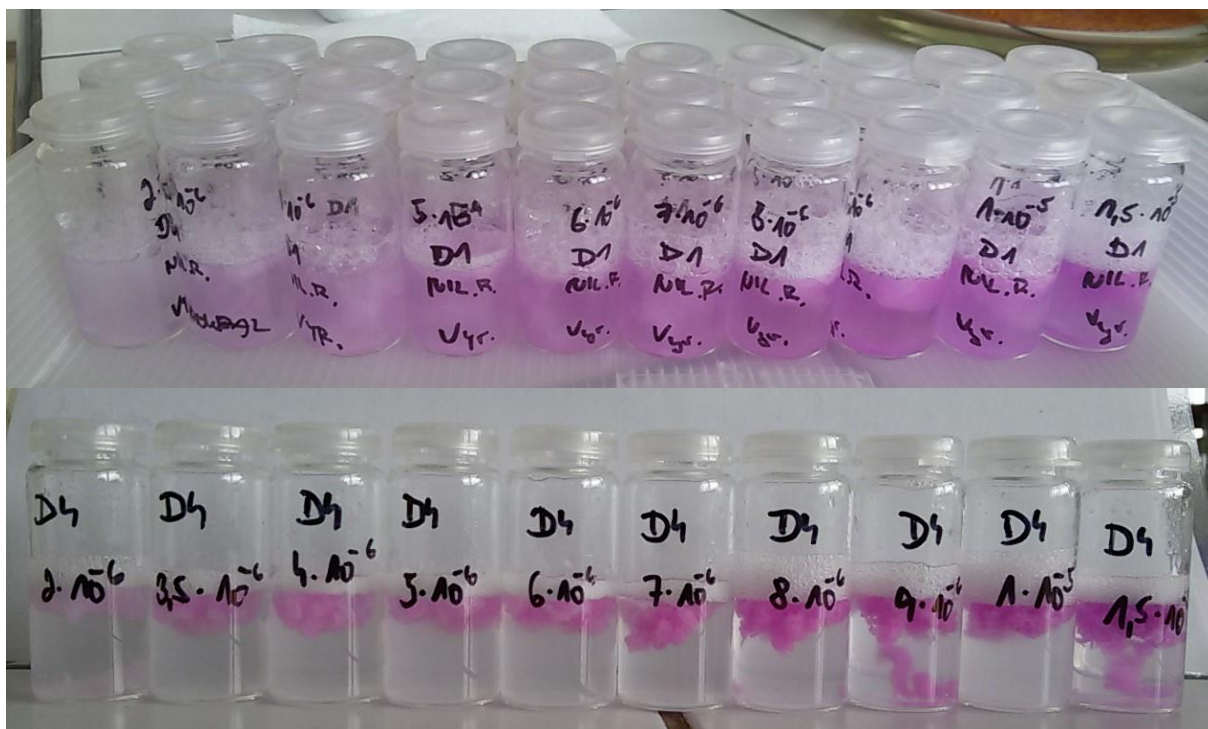
Příslušné množství nilské červeně v acetonu bylo napipetováno do vialek a přebytečný aceton se nechal volně odpařit. Následně se do vialek odměřilo přesné množství roztoku SDS. Směs se nechala přes noc na třepačce. Koncentrace pro kalibrační řady byly zvoleny stejné jako při tvorbě zabarvených gelů. Byla sestavena kalibrační přímka jako závislost absorpance při 553 nm na koncentraci.

4.3.3. Příprava hydrogelů

Hydrogely byly připravovány *mokrou cestou*. Do čistých a suchých vialek byly napipetovány 3 ml 4% (hm.) DEAE-dextranového roztoku a následně byly přidány 3 ml příslušného tenzidu s rozpuštěnou nilskou červení (složení jednotlivých hydrogelů popisuje tabulka 3). Vzniklá směs byla na vortexu důkladně promíchána, gely byly následně ponechány přes noc na třepačce při laboratorní teplotě. Takto byly připraveny obarvené hydrogely obsahující 10 různých koncentrací nilské červeně. Celkem bylo vytvořeno po 30 hydrogelech od každého druhu (D1-D2). Těchto 30 gelů obsahovalo 3 sady po 10 různých koncentracích nilské červeně. Podobným způsobem byly připravovány i gely s STS (D3-D4), ty ale musely být hned po přípravě umístěny zpět do sušárny při 50 °C, jinak by došlo k vysrážení rozpuštěného STS.

Tabulka 3: Složení jednotlivých dextranových hydrogelů a jejich značení.

| DEAE-dextran – SDS | | | | |
|-------------------------------|------------|-----------------------|------------|----------|
| koncentrace zásobních roztoků | | koncentrace ve vzorku | | označení |
| 4 hm. % DEAE | 400 mM SDS | 2 % DEAE | 200 mM SDS | D1 |
| | 100 mM SDS | | 50 mM SDS | D2 |
| DEAE-dextran – STS | | | | |
| 4 hm. % DEAE | 200 mM STS | 2 % DEAE | 100 mM STS | D3 |
| | 150 mM STS | | 75 mM STS | D4 |



Obrázek 11: Hydrogely obarvené NR ihned po přípravě a promíchání na vortexu. Nahoře gely D1, dole gely D4.

4.4. Provedené experimenty

4.4.1. Uvolňování sondy z gelu D1 a D2

Vytvořené hydrogely D1 a D2 obsahující nilskou červeň byly vždy ponechány přes noc na třepačce a následující den byla měřena absorbance původních supernatantů. Po změření původních supernatantů po 24 hodinách od výroby gelů byl ponechán původní supernatant vždy u 1 sady (10 koncentrací NR) od každého typu gelů D1-D2. U další sady byly původní supernatanty vyměněny za 5 ml příslušného SDS (400 mM nebo 100 mM) a u třetí sady byl supernatant vyměněn za 5 ml 0,15 M NaCl. Takže například 10 gelů D1 s koncentracemi NR 2; 3,5; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15 μ M obsahovalo původní supernatant, 10 gelů D1 mělo supernatant vyměněný za 5 ml 400 mM SDS a 10 gelů D1 obsahovalo 5 ml 0,15 M NaCl. Následně byla měřena změna absorbance pomocí spektrofotometru Hitachi u všech supernatantů po určitých časových intervalech.

4.4.2. Uvolňování sondy z gelu D3 a D4.

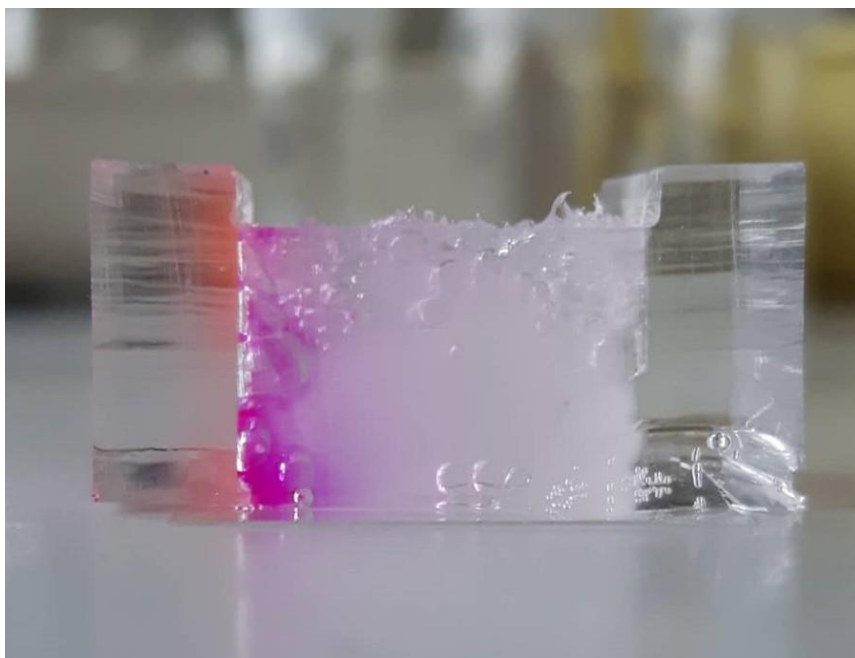
Gely D3 a D4 musely být vždy hned po přípravě umístěny do sušárny vyhřáté na 50 °C, aby nedošlo k vysrážení zbylého STS v roztoku. Při pokusech měřit tyto gely na spektrofotometru docházelo po nalití roztoku do kyvety k okamžitému zákalu vlivem ochlazení od kyvety. U gelů D3 a D4 budou experimenty dále pokračovat, ale pro studium uvolňování bude v dalších letech použita metoda FCS.

4.4.3. Uvolňování sondy z plošného zdroje

Dále bylo provedeno několik experimentů s uvolňováním sondy NR z plošného zdroje. Do dvou seřezaných plastových kyvet byl převeden čistý, neobarvený gel D1 a D2, tak aby gel vyplňoval celou kyvetu až po okraj. Následně byly gely v kyvetách centrifugovány, aby se z nich uvolnily bublinky vzduchu a došlo k homogenizaci. Tento postup byl několikrát opakován, než došlo k úplnému naplnění kyvety. Do nilské červeně v acetonu byl na 5 minut ponořen ústřížek filtračního papíru s rozměry kyvety. Po vytáhnutí se přebytečný aceton nechal volně odpařit a následně byl papírek s NR položen na gel v kyvetě. Poté se kyveta přikryla parafilmem a otočila dnem vzhůru, aby gel stekl na proužek papíru a došlo tak k úplnému kontaktu na rozhraní papír – gel.

Pro experimenty s plošným zdrojem uvolňování byla použita i část mikrotitrační destičky. Destička byla postavena nastojato a na boční stěnu žlábků byla nanesena kapka NR v acetonu, aceton byl ponechán volně se odpařit a do žlábků byl následně opatrně nanesen dextranový hydrogel. Jako plošný zdroj tedy sloužila stěna žlábků destičky.

Tyto experimenty se však ukázaly jako ne příliš vhodné. Okem bylo viditelné, že sonda v kyvetách difunduje skrze gel, ale tento pohyb se jevil jako nerovnoměrný. Gel převedený do mikrotitrační destičky byl zpočátku bez bublin, ale po několika hodinách se v gelu vytvořily velké bubliny, které zkreslovaly difuzi NR skrze gel.



Obrázek 12: Experiment s plošným zdrojem. Vytvořené bubliny zkreslovaly difuzi NR skrze gel.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Následující kapitoly popisují chování nilské červeně použité jako sondy v systému supernatant – hydrogel, konkrétně její pohyb v těchto systémech. K pozorování změn a k porovnání těchto změn mezi sebou byly využity 2 typy dextranových hydrogelů zesíťovaných pomocí SDS, které se lišily právě v koncentraci zásobních roztoků použitého SDS. Toto složení a jejich přípravu podrobněji popisuje kapitola 4.3 a tabulka 3. Následné změny absorbance NR v supernatantech byly měřeny spektrofotometricky a pomocí kalibračních přímků byly přepočítávány na přesné koncentrace NR v těchto roztocích.

Výpočty pohybů sondy NR v systémech gel – supernatanty byly vztaženy na objem gelu ve vialce, jeho povrch a hmotnost. Hmotnost gelů ve vialkách byla zjištěna pomocí vážení prázdných vialek a vialek s obsahem gelu na analytických vahách.

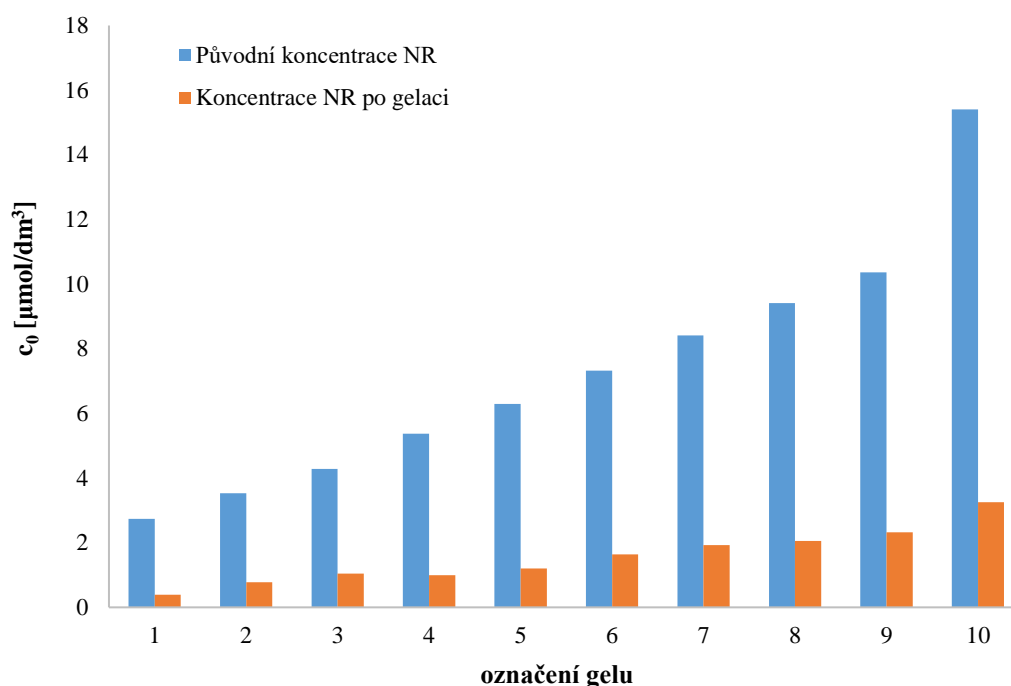
5.1. Dextran s 400 mM SDS (D1)

Tyto gely byly připraveny smísením 4% (hm.) roztoku dextranu a 400 mM roztoku SDS s nilskou červení o různých koncentracích a vznikly tak přímo zabarvené gely nilskou červení. Další den po přípravě, tedy 24 hodin po přípravě gelů byla měřena absorbance supernatantů. Z ní byla posléze vypočítána koncentrace NR. Tato koncentrace byla považována jako výchozí koncentrace a sloužila pro porovnání změn koncentrací v dalších dnech od výroby gelů.

Tabulka 4: Označení jednotlivých gelů D1, původní koncentrace NR v roztoku SDS a koncentrace NR v supernatantu a v gelu po gelaci.

| označení gelu | požadovaná koncentrace NR [μmol/dm ³] | přesná koncentrace NR [μmol/dm ³] | koncentrace NR v supernatantu po gelaci [μmol/dm ³] | koncentrace NR v gelu [μmol/dm ³] |
|---------------|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 2,739 | 0,391 | 6,265 |
| 2 | 3,5 | 3,526 | 0,781 | 6,671 |
| 3 | 4 | 4,285 | 1,042 | 7,648 |
| 4 | 5 | 5,370 | 0,990 | 11,163 |
| 5 | 6 | 6,292 | 1,198 | 12,888 |
| 6 | 7 | 7,323 | 1,641 | 13,766 |
| 7 | 8 | 8,408 | 1,927 | 15,588 |
| 8 | 9 | 9,411 | 2,057 | 17,948 |
| 9 | 10 | 10,361 | 2,318 | 19,494 |
| 10 | 15 | 15,405 | 3,255 | 29,940 |

Obrázek 13 popisuje původní naměřenou koncentraci nilské červeně v roztoku 400 mM SDS, ze kterého byl vytvořen gel D1 a její následnou koncentraci v supernatantu po vytvoření gelu. Následující dny byly sledovány změny koncentrací nilské červeně v původním supernatantu a ve vyměněných supernatantech za nové 400 mM SDS a 0,15 M NaCl. Změny v koncentraci NR byly porovnávány právě s daty naměřenými 24 hodin po vytvoření gelů. Z dat naměřených po 24 hodinách vyplývá, že s rostoucí koncentrací NR roste i množství, které gel dokáže do své struktury navázat. Dochází tak k zakoncentrování NR uvnitř gelu (viz tabulka 4). Obrázek 13 popisuje koncentraci NR v zásobním roztoku SDS a následnou koncentraci po začlenění části NR do struktury gelu po gelaci.

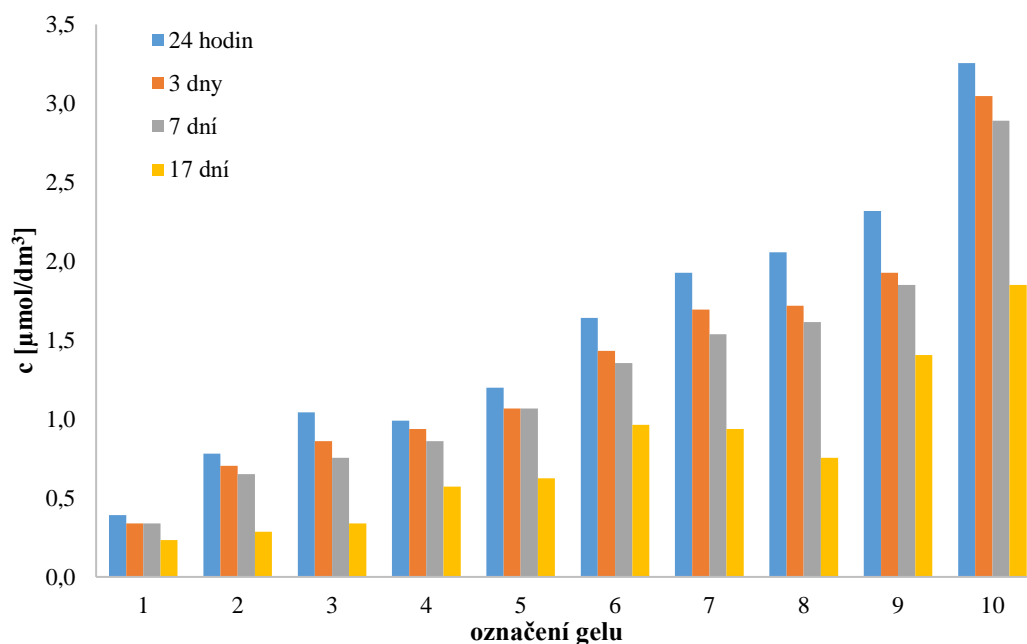


Obrázek 13: Srovnání původní koncentrace NR v SDS a koncentrace NR v supernatantu po gelaci.

5.1.1. D1 s původním supernatantem

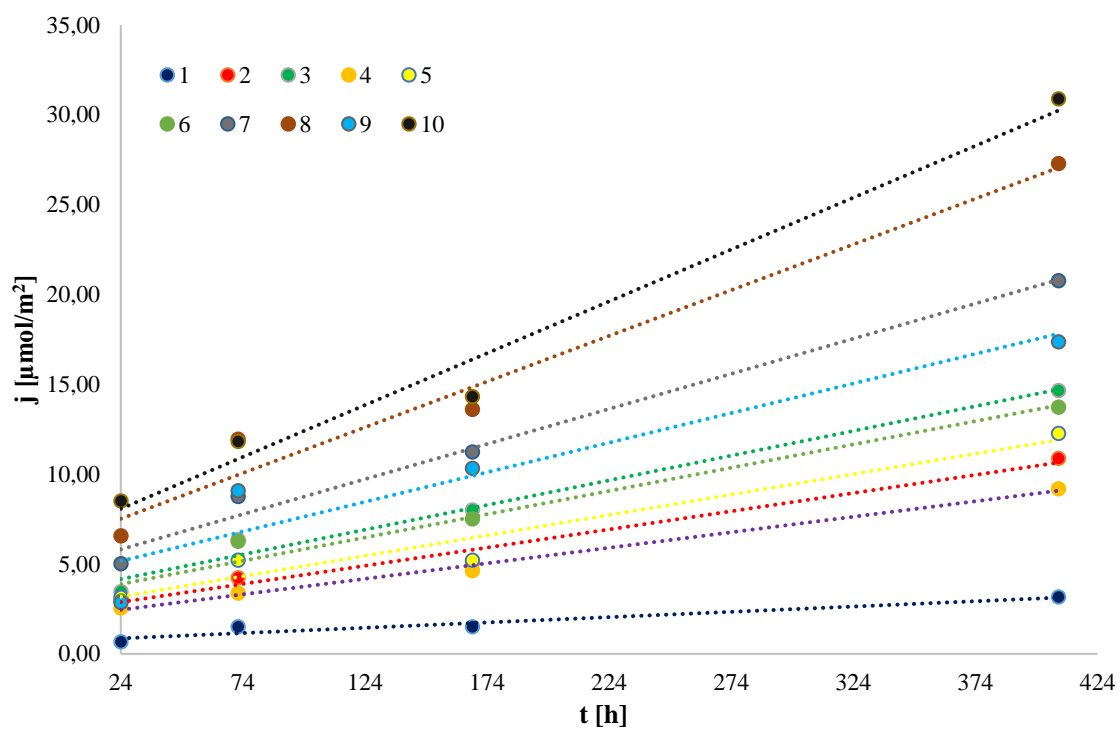
U této sady 10 gelů D1 byl po celou dobu měření ponechán původní supernatant, který byl použit při vytváření gelů. Zásobní roztok SDS, rozpuštěný v 0,15 M NaCl měl počáteční koncentraci 400 mM. Po smíchání 3 ml 400 mM SDS a 3 ml 4% (hm.) zásobního roztoku dextranu byla koncentrace SDS poloviční, tedy 200 mM. Hned po smíchání zásobních roztoků a vytvoření gelu bylo okem viditelné, že roztok byl prakticky bezbarvý a gel, který byl bezprostředně po přípravě rozptýlen v tomto roztoku, byl zabarven do růžova vlivem navázané nilské červeně. Měření supernatantu bylo prováděno po časových intervalech: 24 hodin, 3 dny, 7 dní a 17 dní. Údaje koncentrací získané za celou dobu pozorování shrnuje obrázek 14.

Z naměřených dat je patrné, že koncentrace sondy v původním supernatantu neustále klesá, což znamená, že sonda přechází z roztoku stále do gelu. Při tvorbě gelů se u gelů D1 vždy v průměru 22 % z celkové koncentrace NR v zásobních roztocích SDS navázalo do gelu. Následná měření ukázala, že toto množství není konečná kapacita gelů D1. Původním předpokladem bylo, že NR se bude z gelu postupně uvolňovat a absorbance tak bude narůstat. Avšak při ponechání původního supernatantu koncentrace nilské červeně s postupem času neustále klesala a docházelo tak k zakonzentrovávání do gelu. Po celkových 17 dnech pozorování klesla koncentrace zbylé NR v původním roztoku nad gelem zhruba na polovinu.

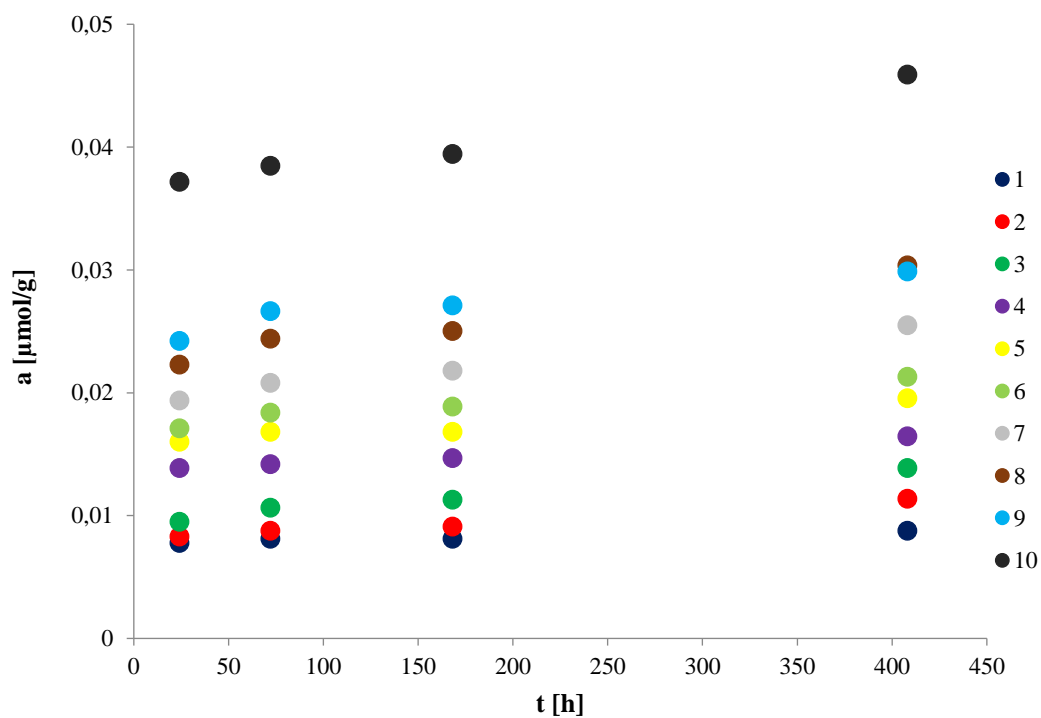


Obrázek 14: Změny koncentrací nilské červeně v původním supernatantu u gelu D1 sledované po dobu 17 dnů.

S vyšší koncentrací NR se u jednotlivých gelů 1-10 zvyšoval i difúzní tok. U nejnižší koncentrace sondy $2 \mu\text{mol/dm}^3$ byl difúzní tok $6,22 \mu\text{mol/m}^2$, u největší koncentrace této sondy byl tok téměř 9krát vyšší a to $51,81 \mu\text{mol/dm}^3$. Se zvyšující se počáteční koncentrací NR v supernatantu se zvyšovalo i množství, které bylo navázáno v gelu. Množství navázané sondy bylo vztaženo na 1 gram gelu. Původní předpoklad před zahájením měření byl, že se nilská červeně bude z gelu postupně uvolňovat a bude tak simulovat potenciální distribuci léčiva. Vyhodnocení dat ale ukázalo, že se nilská červeně naopak do struktury gelu ještě více váže. Obrázek 15 popisuje difúzní tok sondy z roztoku do hydrogelu v závislosti na čase. Závislosti byly využity pro výpočet difúzního koeficientu dle rovnice (3) na straně 25. Difúzní koeficient sondy v systému gel D1 – původní supernatant je $1,2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.



Obrázek 15: Závislosti difuzního toku NR na čase po dobu 17 dní v systému dextran-původní supernatant.

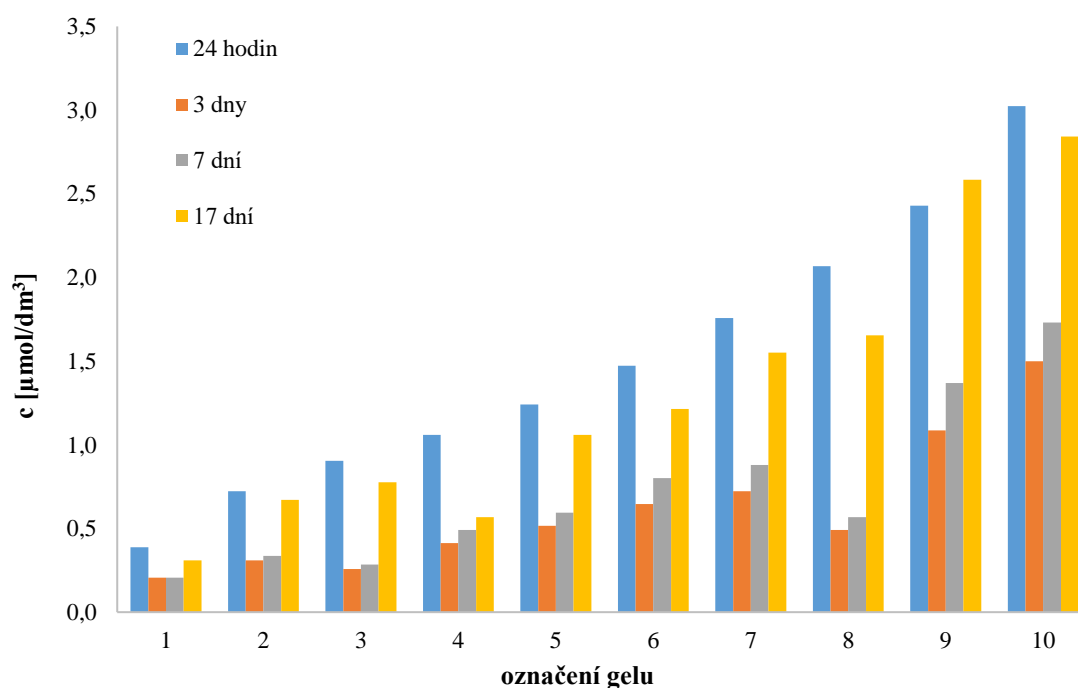


Obrázek 16: Množství navázané nilské červeně vztahované na hmotnost gelu D1 v závislosti na čase.

S ubývajícím množstvím nilské červeně v roztoku se zvyšuje množství, které je navázané ve struktuře gelu. Tyto změny popisuje obrázek 16. Hmotnost gelu D1 vzniklého ve vialkách byla $0,8056 \pm 0,0140$ g. S rostoucí koncentrací nilské červeně v roztoku se zvyšovalo i množství, které bylo schopné se navázat do gelu.

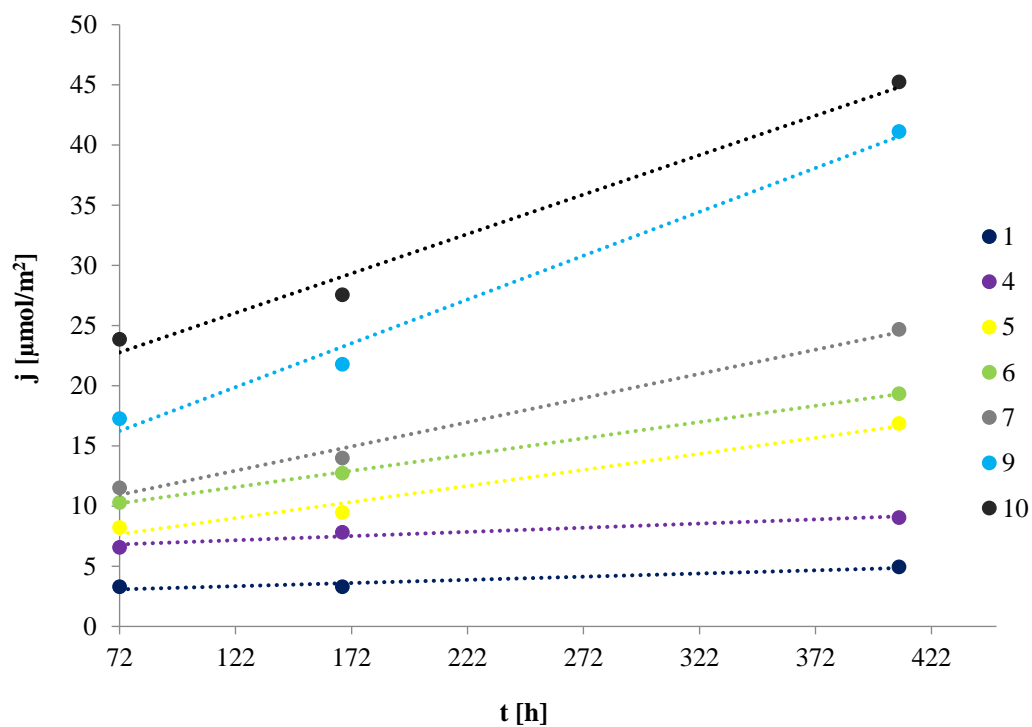
5.1.2. D1 s vyměněným supernatantem za SDS

Pro pozorování chování sondy NR v jiném prostředí, než je původní supernatant byl původní roztok nad gelem po 24 hodinách opatrně odlit tak, aby nedošlo k zasažení do gelu. Následně bylo do vialek s gelem odměřeno 5 ml 400 mM SDS čímž byl nahrazen původní supernatant. Další měření probíhala už s novým supernatantem. Následující obrázek 17 popisuje změny koncentrací NR v supernatantu před výměnou a po výměně SDS.

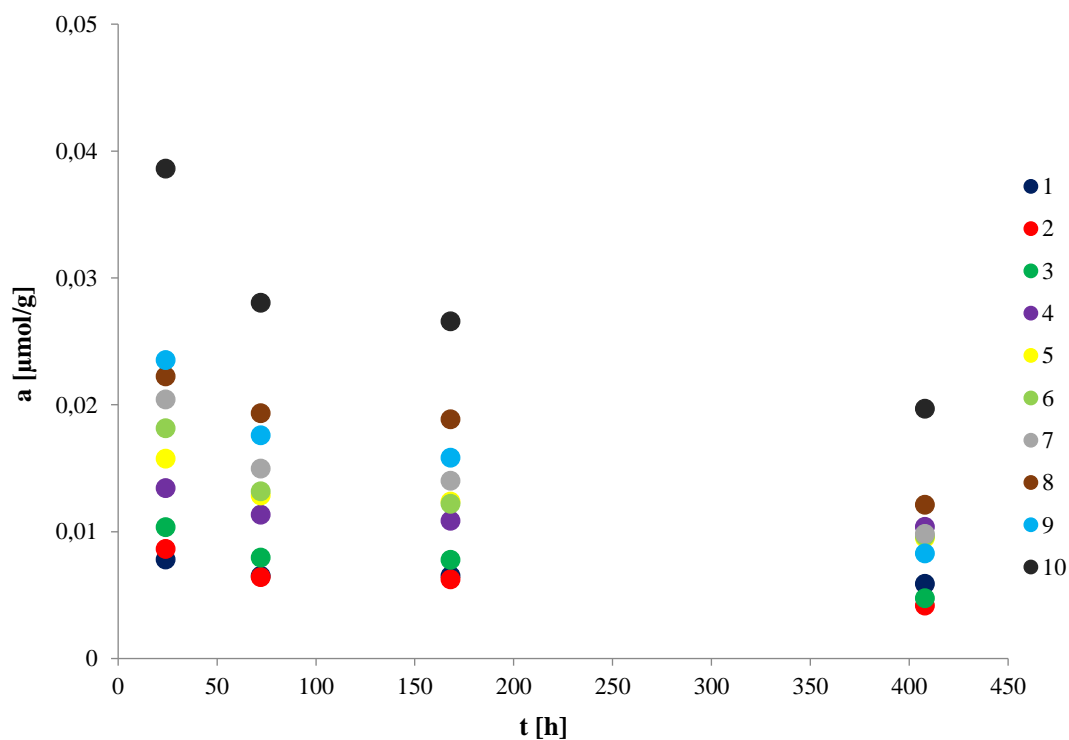


Obrázek 17: Změny koncentrace NR v supernatantu. Po 24 hodinách byl původní supernatant vyměněn za 400 mM SDS.

Po výměně supernatantu dochází k postupnému uvolňování nilské červeně ze struktury gelu zpět do roztoku. Tento děj je zřejmě podmíněn prostou difuzí, kdy dochází k přechodu sondy z prostředí gelu, kde je po výměně supernatantu daleko vyšší koncentrace, do prostředí nově přidaného 400 mM SDS, ve kterém je z počátku nulová koncentrace NR. Dochází tedy k ustavení rovnováhy koncentrace mezi hydrogelem a novým prostředím SDS. Po 17 dnech je koncentrace sondy v roztoku téměř stejná, jako byla na počátku ještě před výměnou supernatantu. Přičemž difuzní tok sondy do gelu se s časem zvyšuje. Změny v toku sondy popisuje obrázek 18. V grafu jsou zaznamenány hodnoty od třetího dne měření, tedy až po výměně supernatantu.



Obrázek 18: Difuzní toky sondy u gelů D1 po výměně původního supernatantu za 400 mM SDS. Pro přehlednost jsou zobrazeny jen vybrané gely D1.

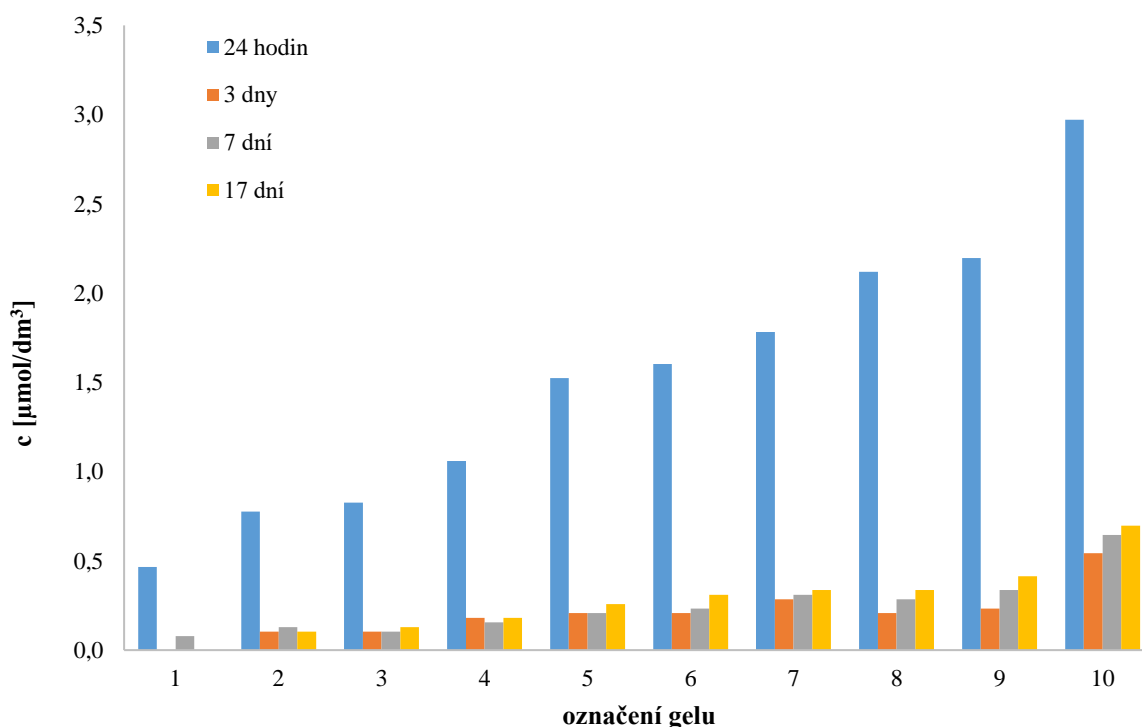


Obrázek 19: Množství navázané nilské červeně vztahované na hmotnost gelu v závislosti na čase před a po výměně supernatantu za 400 mM SDS. Data jsou zaznamenána v časovém intervalu: 24, 72, 168 a 408 hodin.

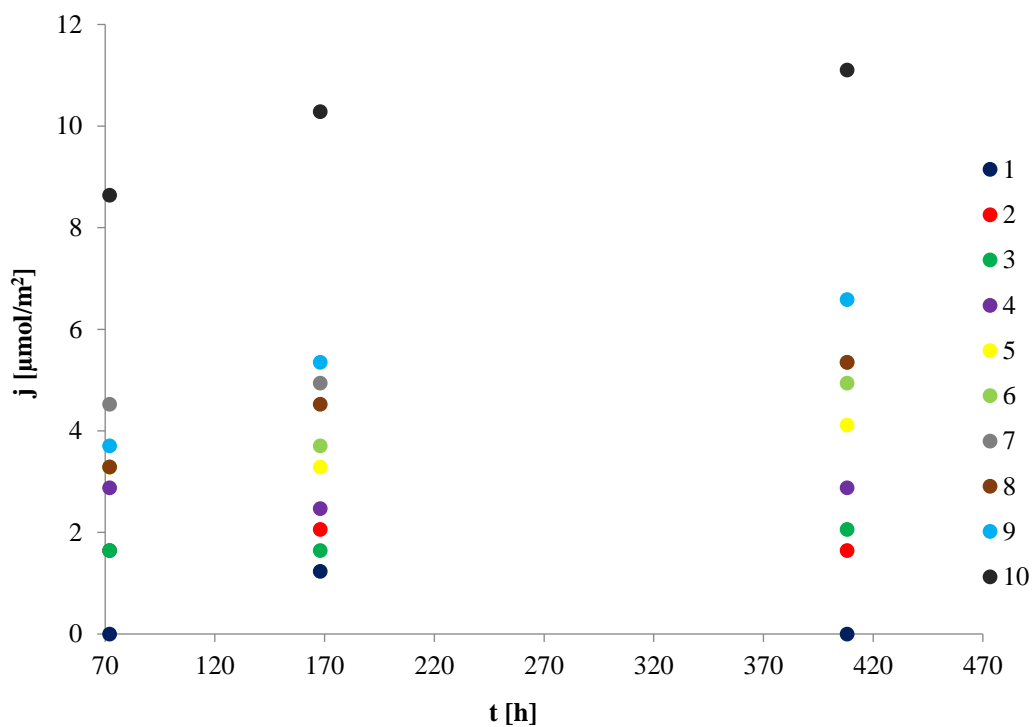
Původní supernatant v sobě obsahuje část nilské červeně, která se při tvorbě gelu nezačlenila do struktury gelu. Toto množství se při výměně supernatantu společně se supernatantem odlije a nilská červeně tak začne difundovat do nového roztoku. Toto má za následek prudké snížení navázaného množství nilské červeně v gelu. Následující dny po výměně se navázané množství mění už jen pozvolna. Difuzní tok, se kterým se mění navázané množství je vyjádřen v $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ a popisuje jej obrázek 18. Difuzní koeficient byl vypočítán stejným způsobem jako u gelu D1 s původním supernatantem. Jeho hodnota pro systém gel D1 – roztok 400 mM SDS je $5,58 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$.

5.1.3. D1 s vyměněným supernatantem za NaCl

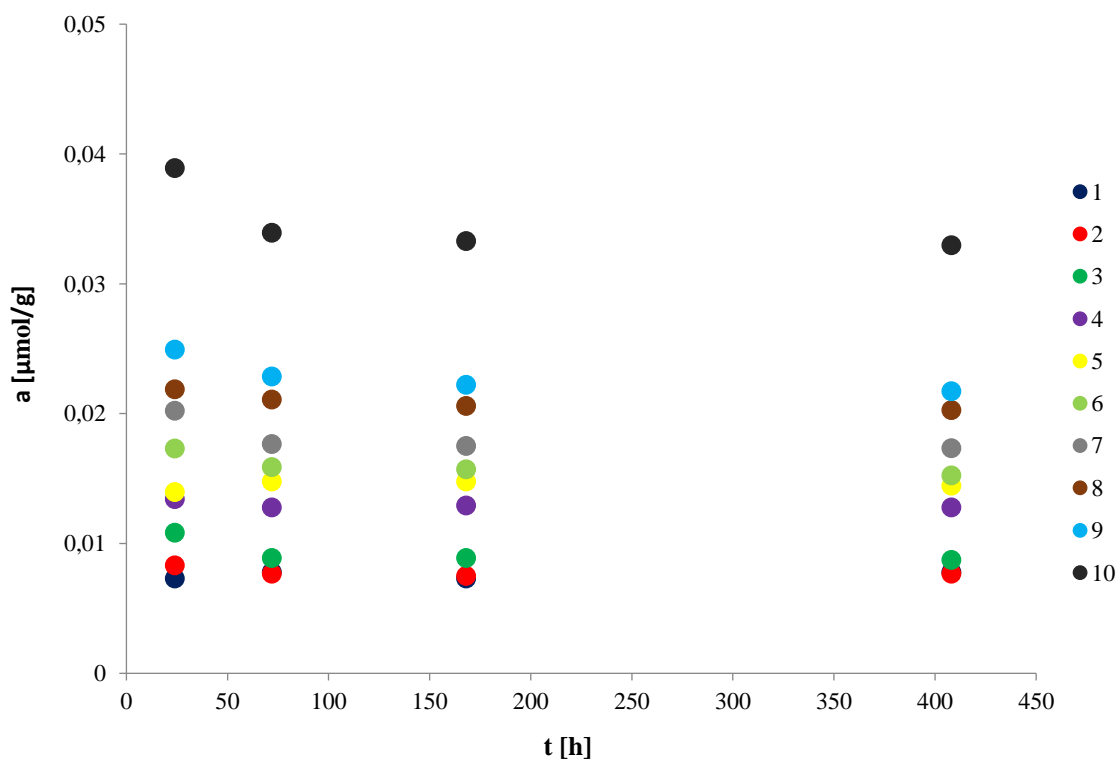
U těchto systémů byl původní supernatant po 24 hodinách vyměněn za roztok 0,15 M NaCl. Tento roztok byl použit i při tvorbě všech zásobních roztoků a slouží jako simulace pohybu sondy ve fyziologickém roztoku. Z naměřených dat za 17 dní vyplývá, že nilská červeně se do roztoku NaCl uvolňuje daleko méně než do roztoku s rozpuštěným SDS. Na rozdíl od NR v původním supernatantu, která se naopak do gelu vstřebává, dochází alespoň k částečnému uvolňování. Všechny změny v koncentracích sondy po dobu 17 dní shrnuje obrázek 20. Z grafu na tomto obrázku je patrné, že u nejnižší koncentrace nilské červeně, tedy u gelu č. 1, je změna v množství nilské červeně v novém roztoku úplně minimální a spektrofotometrem nezměřitelná. U vyšších koncentrací nilské červeně jsou už změny zaznamenatelné a s rostoucí koncentrací se zvyšuje i množství NR, které se zpětně uvolní do roztoku 0,15 M NaCl.



Obrázek 20: Srovnání změn koncentrací NR v supernatantech jednotlivých gelů před a po výměně supernatantu za roztok 0,15 M NaCl.



Obrázek 21: Difuzní tok sondy u gelů D1 po výměně původního supernatantu za 0,15 M NaCl.



Obrázek 22: Množství navázané nilské červeně vztažené na hmotnost gelu v závislosti na čase před a po výměně supernatantu za 0,15 M NaCl. Data jsou zaznamenána v časovém intervalu: 24, 72, 168 a 408 hodin.

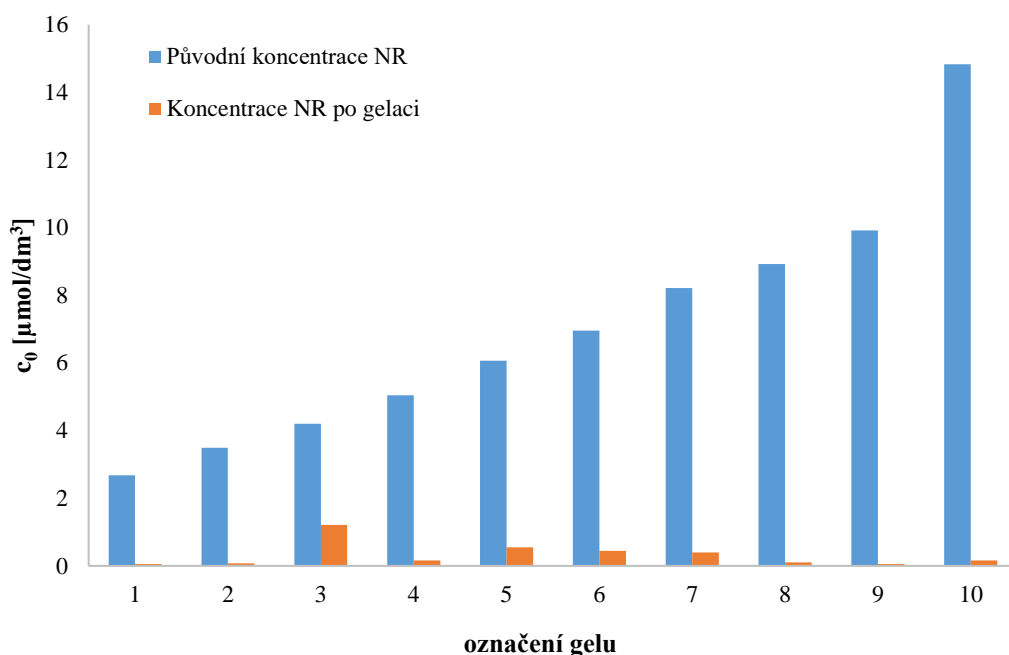
Difuzní tok u systému gel D1 – roztok 0,15 M NaCl se s časem téměř nemění, nebo se mění chaoticky. Děje se tak vzhledem k velmi nízkým hodnotám naměřených koncentrací. Množství navázané nilské červeně se kromě odlití původního supernatantu a výměně za roztok NaCl prakticky nemění. Pokud nastává nějaká změna, je neměřitelná. Mezi množstvím nilské červeně v gelu a v roztoku se ustavuje rovnováha podobně jako v předchozích případech. Vzhledem k téměř neměnitelným hodnotám nelze spočítat difuzní koeficient.

5.2. Dextran se 100 mM SDS (D2)

Gely byly připraveny smícháním zásobního roztoku 4 hm. % DEAE-dextranu s jednotlivými zásobními roztoky 100 mM SDS, ve kterých byly rozpuštěny různé koncentrace nilské červeně. Směs roztoků byla řádně promíchána na vortexu a umístěna na třepačce do dalšího dne. Po 24 hodinách byla měřena absorbance supernatantů a následně byly supernatanty u 2 koncentračních řad nilské červeně vyměněny za roztok 100 mM SDS a 0,15 NaCl. U jedné řady byl opět ponechán původní supernatant. Následující tabulka 5 a obrázek 23 popisují změnu koncentrace nilské červeně v roztoku způsobenou vytvořením gelu, tedy množství NR, které se ihned po vytvoření naváže do gelu.

Tabulka 5: Označení jednotlivých gelů D2, původní koncentrace NR v roztoku SDS a koncentrace NR v supernatantu a v gelu po gelaci.

| označení gelu | požadovaná koncentrace NR [μmol/dm ³] | přesná koncentrace NR [μmol/dm ³] | koncentrace NR v supernatantu po gelaci [μmol/dm ³] | koncentrace NR v gelu [μmol/dm ³] |
|---------------|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 2,3945 | 0,052 | 6,925 |
| 2 | 3,5 | 3,2438 | 0,078 | 9,344 |
| 3 | 4 | 3,9836 | 1,189 | 6,008 |
| 4 | 5 | 4,8603 | 0,155 | 13,806 |
| 5 | 6 | 5,9288 | 0,543 | 15,073 |
| 6 | 7 | 6,8603 | 0,439 | 18,384 |
| 7 | 8 | 8,1753 | 0,388 | 22,588 |
| 8 | 9 | 8,9151 | 0,103 | 26,228 |
| 9 | 10 | 9,9562 | 0,052 | 29,610 |
| 10 | 15 | 15,0795 | 0,155 | 44,463 |



Obrázek 23: Srovnání původní koncentrace NR ve 100 mM SDS a koncentrace NR v supernatantu po gelaci.

Gely D2 dokáží oproti gelům D1 do své struktury navázat daleko více sondy. Dá se říci, že nilskou červeně z původního roztoku SDS prakticky všechnu vysají. Už při tvorbě těchto gelů je okem viditelné, že se původně zabarvený roztok okamžitě s vytvořením gelu odbarví a vzniká silně zabarvený gel. U gelů D1 můžeme na obrázku 14, **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** a 20 pozorovat, že se nilská červeně při gelaci váže do gelu vždy zhruba ve stejném množství a můžeme vidět závislost na původní koncentraci NR v zásobním roztoku 400 mM SDS. U gelů D2 však dochází k téměř úplnému vstřebání nilské červeně při gelaci do gelu nezávisle na její původní koncentraci v roztoku. Dalším zajímavým faktem je, že některé gely D2 naváží většinu NR, ale některé absorbují z roztoku při gelaci jen malou část a většina zůstane v supernatantu. Tyto rozdíly u jednotlivých gelů D2 můžeme sledovat například na obrázku 25.

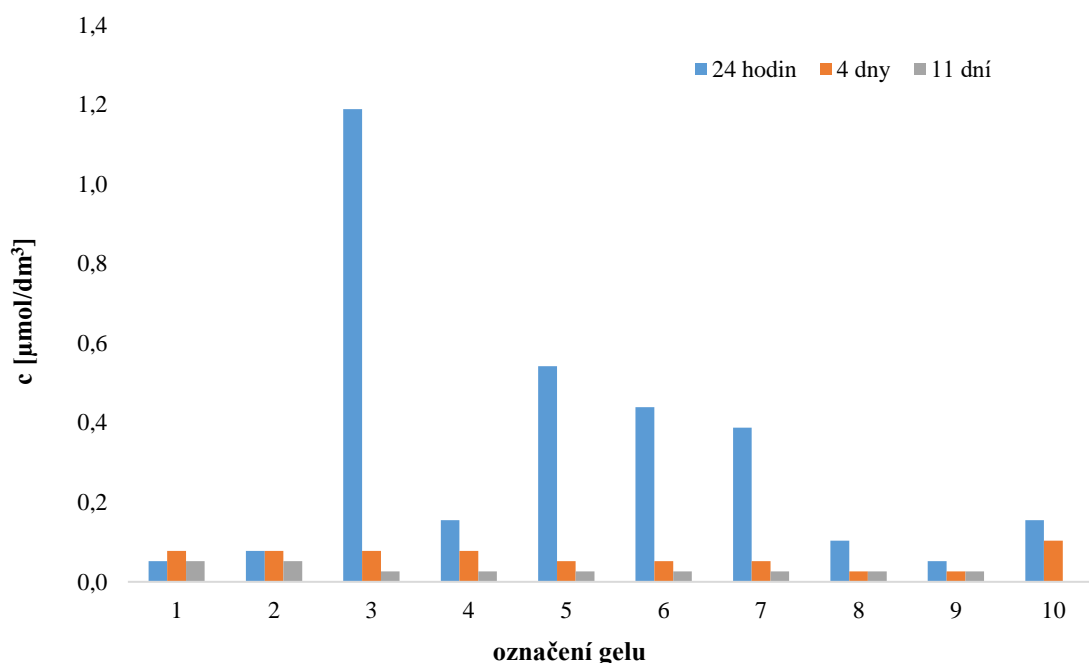
Nerovnoměrné absorbování nilské červeně ze zásobních roztoků může být způsobováno vznikem agregátů nilské červeně jen v určitých částech gelu, což můžeme vidět na obrázku 24. U gelů D1 byl vzniklý gel zabarven víceméně rovnoměrně v celém svém objemu. U gelů D2 se objevovaly pouze v určitých místech koncentrované oblasti. S rostoucí koncentrací nilské červeně v zásobních roztocích použitých k přípravě gelů byly následně vzniklé agregáty intenzivněji zabarveny. S rostoucí koncentrací nedocházelo k rozšiřování agregátů ale právě k jejich většímu zakoncentrování. Zbylé množství NR v roztoku nad gelem se během následujících 24 hodin na třepačce viditelně zakoncentrovalo na rozhraní gel – supernatant.



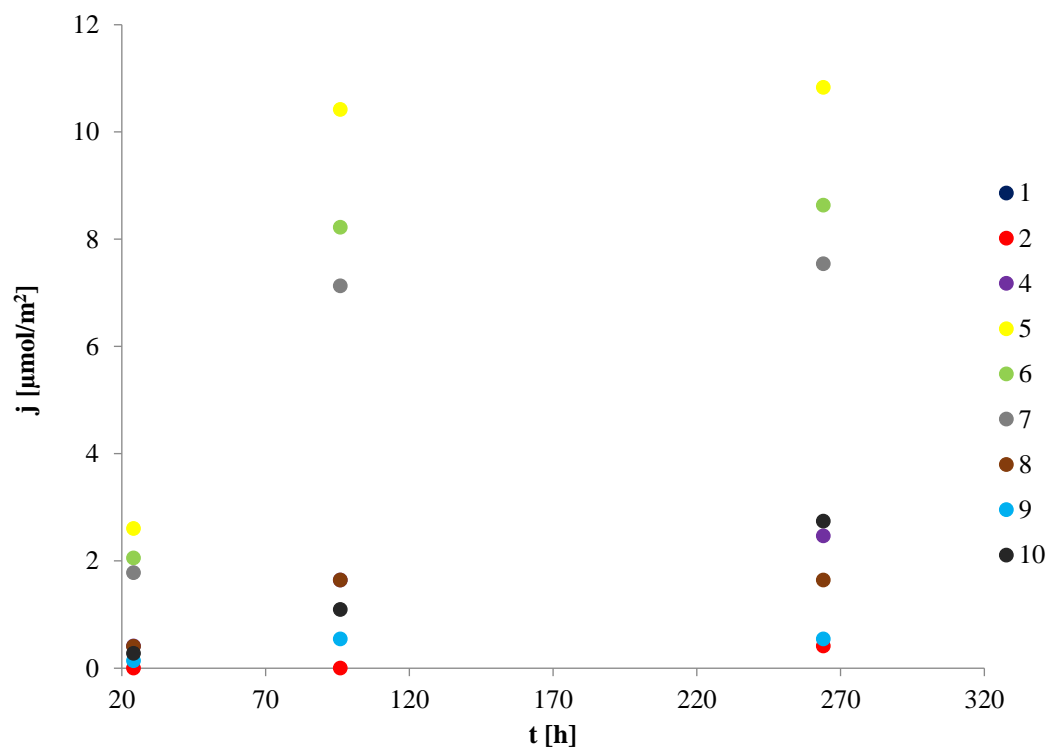
Obrázek 24: Ukázka vznikajících agregátů nilské červeně ve strukturách gelů D2. Na obrázku je konkrétně gel číslo 6 (koncentrace NR použitá při výrobě byla $7 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$).

5.2.1. D2 s původním supernatantem

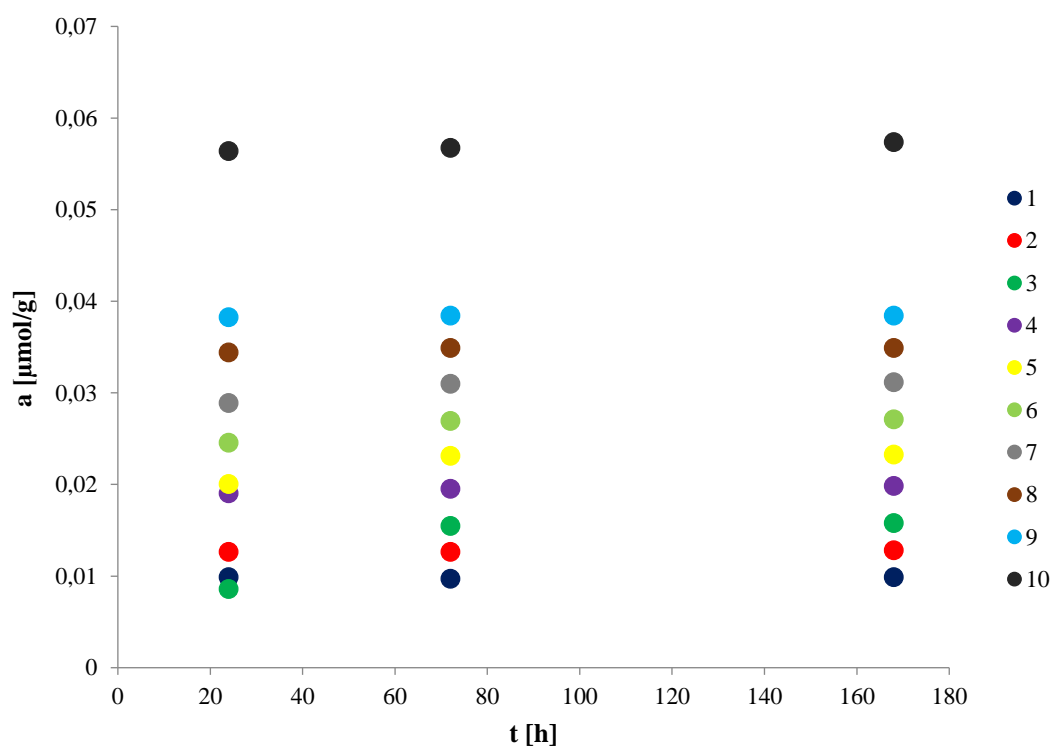
Stejně jako u gelů D1 byl i u jedné sady gelů D2 ponechán po celou dobu měření původní supernatant. Jak již bylo zmíněno, u gelů D2 dochází u většiny jednotlivých gelů k téměř úplnému vstřebání sondy. Pokud nedojde k absorbování už při gelaci, stane se tak během několika následujících dní.



Obrázek 25: Změny koncentrací nilské červeně v původním supernatantu u gelu D2 sledované po dobu 11 dnů.



Obrázek 26: Difuzní tok sondy u gelů D2 při ponechaném původním supernatantu.

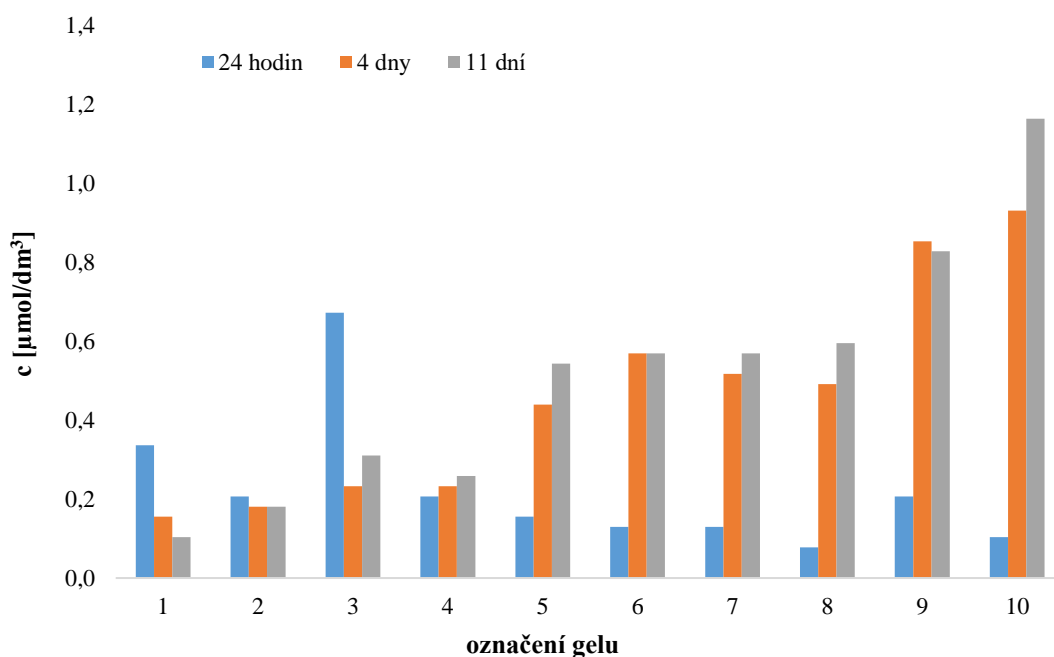


Obrázek 27: Množství navázané nilské červeně vztahované na hmotnost gelu v závislosti na čase při ponechaném původním supernatantu. Data jsou zaznamenána v časovém intervalu: 24, 96 a 264 hodin.

V závislosti na množství NR vstřebané ihned po gelaci se mění i hodnoty toku a množství navázané NR vztažené na gram gelu. Vzhledem k velkému množství vstřebané NR hned při gelaci a v dalších dnech jsou následně naměřené koncentrace v roztoku velice malé. S tím souvisí i téměř neměnné rychlosti toku. Kromě gelů s označením 3, 5, 6 a 7, u těch se difuzní tok změní mezi měřením při 24 hodinách a 4 dnech vlivem vstřebání malého množství NR už při gelaci. Získaná data byla následně zpracována jako v případě D1. Obrázek 26 zobrazuje difuzní tok sondy v závislosti na odmocnině času. Ze směrnic toků byl vypočítán difuzní koeficient sondy v systému hydrogel D2 – původní supernatant. Difuzní koeficient je u tohoto systému $5,58 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

5.2.2. D2 s vyměněným supernatantem za SDS

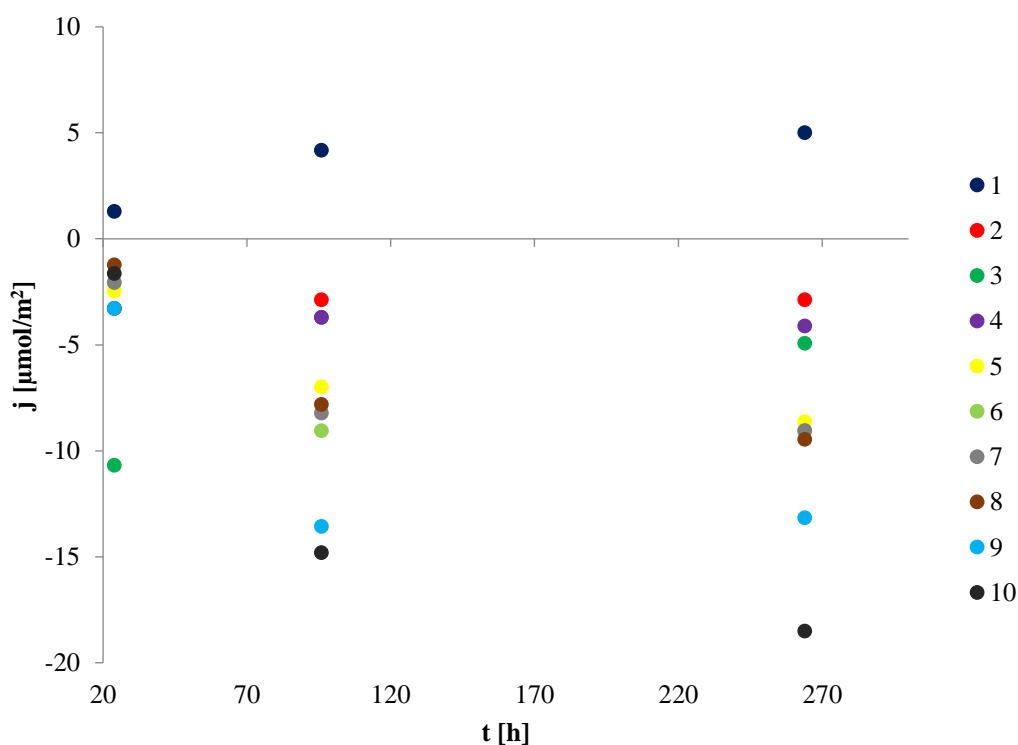
Po 24 hodinách od přípravy gelů byl supernatant vyměněn za 100 mM roztok SDS. Jak je z následujícího obrázku 28 patrné, po výměně supernatantu dochází u gelů s původní koncentrací NR vyšší než $6 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (gely s označením 5 a výš) k rychlému uvolňování a zřejmě dochází k pomalému ustavování rovnováhy mezi oběma fázemi.



Obrázek 28: Změny koncentrací NR v supernatantu u gelů D2 po výměně původního supernatantu za 100 mM SDS.

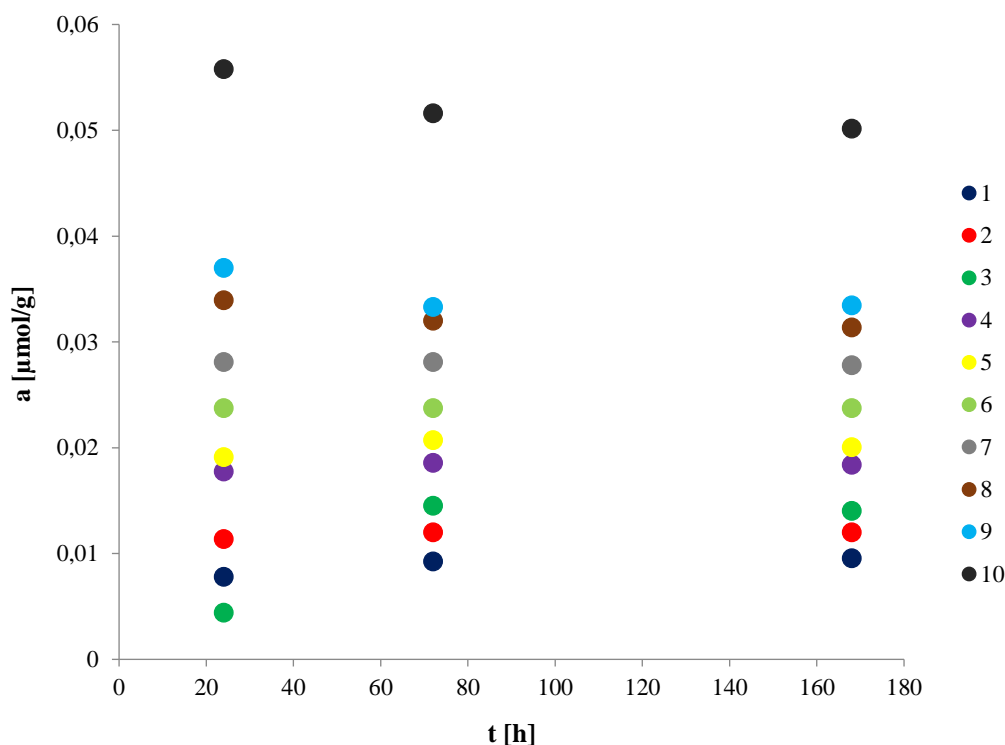
Největší změny v systémech gely D2 – 100 mM roztok SDS nastávají s vyššími koncentracemi. U vysokých koncentrací je i nejvyšší difuzní tok a pozorovatelná změna v navázaném množství. U gelů s nejnižší koncentrací sondy dochází k difuzi zpět do gelu. Po výměně původního supernatantu za čistý roztok SDS dojde k uvolnění NR z gelu do supernatantu, ale poté se sonda vrací zpátky do gelu. U systémů s označením 2-4 se difuzní tok prakticky nemění. Jen u gelu č. 3 se tok změní mezi měřením po 24 hodinách a 4 dnech.

Tato změna je způsobena malým množstvím vstřebané sondy při gelaci a jejím následným navázáním do gelu až v průběhu dalších dní. U systémů 5-10 dochází k uvolňování sondy z gelu do supernatantu. Změna v koncentraci NR v roztoku je nejvyšší mezi měřeními po 24 hodinách a 4 dnech. Vysoká změna je způsobena novým roztokem SDS, který neobsahuje žádnou nilskou červeň. Dochází tak k difuzi sondy do prostředí s její nulovou koncentrací. Koncentrace NR se v roztoku dále zvyšuje a rychlost difuze sondy se s rostoucí koncentrací snižuje a dochází k ustavení rovnováhy. U systémů s měnícím se difuzním tokem (1; 5-10) mohla být následně pomocí získaných dat určena směrnice regrese a z této směrnice mohl být vypočítán difuzní koeficient. Změny v difuzním toku NR popisuje obrázek 29. U tohoto systému byly určeny 2 difuzní koeficienty – jeden pro nejnižší koncentraci sondy, kde docházelo k absorbování do gelu, a druhý pro uvolňování z gelu (gely s označením 5-10). Difuzní koeficient pro absorpci do gelu je $8,34 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ a koeficient pro uvolňování z gelu je $2,96 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$.



Obrázek 29: Difuzní tok sondy u gelů D2 po výměně původního supernatantu za 100 mM roztok SDS.

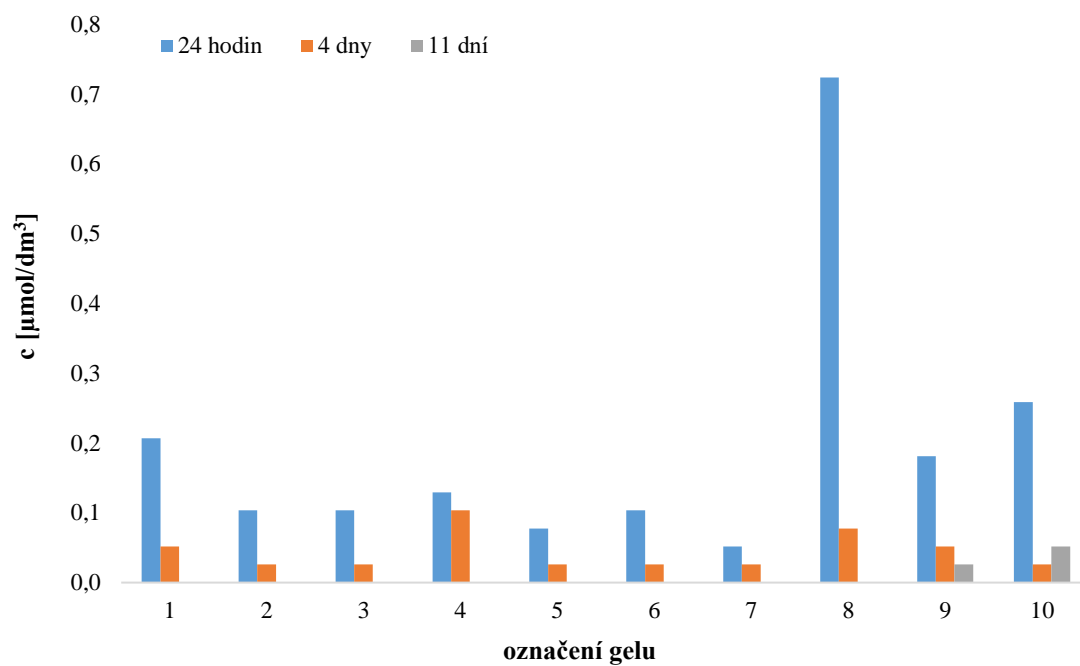
Obrázek 30 popisuje množství navázané nilské červeně v gelu. Z něj je patrné, že u vyšších koncentrací původní sondy dochází ke snižování navázaného množství v gelu – sonda se uvolňuje do roztoku. Sonda v systémech 2-4 se výrazně nemění, popřípadě se mění jen po velmi malých hodnotách a u systému s označením 1 dochází naopak k vázání sondy do gelu.



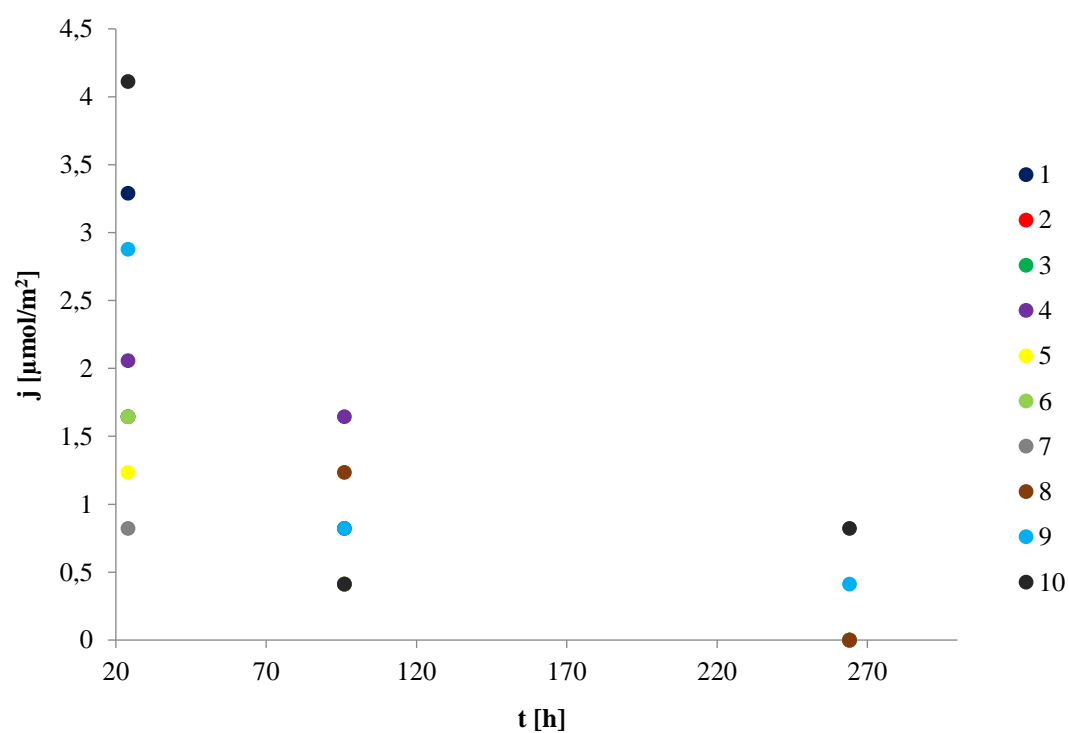
Obrázek 30: Množství navázané nilské červeně vztažené na hmotnost gelu v závislosti na čase před a po výměně původního supernatantu za 200 mM roztok SDS. Data jsou zaznamenána v časovém intervalu: 24, 96 a 264 hodin.

5.2.3. D2 s vyměněným supernatantem za NaCl

Stejně jako u gelů D1 byl i u gelů D2 po 24 hodinách vyměněn původní supernatant za 0,15 M roztok NaCl. Původní koncentrace NR byla už při gelaci téměř všechna navázána do gelu (výjimkou je gel 8). Po výměně supernatantu dojde u všech gelů k prakticky stejnému částečnému uvolnění NR do nového roztoku NaCl. K tomuto uvolňování do roztoku NaCl docházelo i u gelů D1. U nich se koncentrace NR postupně po malých hodnotách neustále zvyšovala a tvořila se postupně rovnováha mezi gelem a roztokem. U gelů D2 dochází ke zcela jiným změnám. Po 4 dnech se nejprve malé množství nilské červeně uvolní do vyměněného roztoku NaCl, ale následně se tok obrátí a nilská červeně se vrací zpět do gelu. Všechny hodnoty jsou ale tak malé, že se difuzní tok (viz obrázek 32) a množství navázané NR (obrázek 33) prakticky nemění, nebo se mění po velmi malých hodnotách.

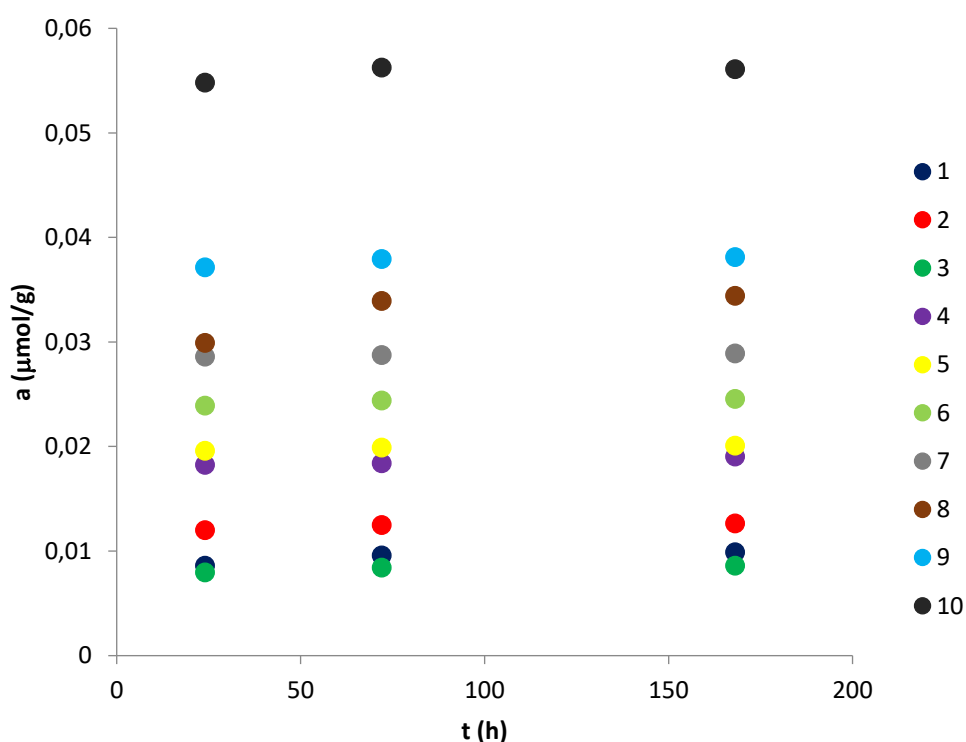


Obrázek 31: Pohyb NR v systému po výměně původního supernatantu za roztok 0,15 M NaCl.



Obrázek 32: Difuzní tok sondy u gelů D2 po výměně původního supernatantu za roztok 0,15 M NaCl.

Difuzní tok sondy u supernatantu vyměněného za NaCl (viz obrázek 32) se nejvíce mění u dat získaných po 24 hodinách, a to vlivem pozůstatku nilské červeně, která se při gelaci nenavázala do gelu. Následně se difuzní tok snižuje až na nulovou hodnotu. Výjimkou jsou gely 9 a 10, kdy je na rozdíl od ostatních gelů nilská červeně měřitelná v roztoku i po 11 dnech. U nižších koncentrací je množství NR v roztoku nulové a tok se tedy zastavuje. Hodnoty naměřené absorbance NR v roztocích po 4 dnech se u většiny systémů, vyjma 4, 8 a 9, shodují s hodnotou toku systému 10 a na obrázku 32 se překrývají. U těchto systémů byl difuzní koeficient získán jen pomocí roztoků s měnící se koncentrací sondy (gely s označením 9 a 10) a jeho hodnota je $1,83 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$.



Obrázek 33: Množství navázané nilské červeně vztažené na hmotnost gelu v závislosti na čase před a po výměně původního supernatantu za 0,15 M roztok NaCl. Data jsou zaznamenána v časovém intervalu: 24, 96 a 264 hodin.

6. ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývá studiem transportních vlastností hydrogelových systémů na bázi dextranu. Transportní vlastnosti byly zkoumány měřením absorbancí v supernatantech gelů pomocí spektrofotometrie v určitých časových intervalech.

Gely byly připravovány „mokrou“ cestou. Nejprve byly připraveny zásobní roztoky dextranu o koncentraci 4 hm. % a tenzidů o rozdílných koncentracích. Roztoky byly připravovány v prostředí 0,15 M NaCl. V zásobních roztocích tenzidů byla rozpuštěna nilská červeně o různých koncentracích pro sledování závislosti transportních vlastností na koncentraci sondy. Smícháním obarveného tenzidu se zásobním roztokem dextranu vznikaly zbarvené gely. Následně byly měřeny absorbance supernatantů v různých časových intervalech a byla pozorována změna v závislosti na čase. První měření probíhalo vždy po 24 hodinách až se vzniklý gel usadil na dně vialky. Vždy byla ponechána jedna sada gelů s původním supernatantem a u dalších dvou sad gelů byl původní supernatant po 24 hodinách vyměněn za roztok SDS nebo 0,15 M NaCl.

Původním předpokladem bylo, že se po vytvoření gelů s obsahem sondy bude tato sonda uvolňovat zpět do roztoku. Při ponechání původního supernatantu docházelo u gelů D1 i D2 k dalšímu inkorporování do gelu. U gelů D1 se při gelaci do gelu začlenilo v průměru stejné procentuální množství z původního množství nilské červeně v zásobních roztocích, a to 22 %. Zbylé množství sondy v supernatantu v průběhu dalších dní dále prostupovalo do gelu. V průběhu 17 dní klesla koncentrace sondy v supernatantu téměř na polovinu vůči množství, které obsahovala po 24 hodinách od přípravy. U gelů D2 docházelo už při gelaci k téměř úplnému navázání sondy do gelu. Sonda se do gelů D2 vážala nezávisle na své původní koncentraci v zásobních roztocích použitých k přípravě gelů. U některých gelů však nedošlo ke kompletnímu navázání ihned po gelaci a po 24 hodinách se v supernatantu vyskytovalo velké množství nilské červeně. Toto množství se však do dalšího měření po 4 dnech snížilo na prakticky podobnou hodnotu jako u gelů, u kterých došlo ke kompletnímu navázání už při gelaci. Gely D2 do své struktury navázaly téměř veškeré množství použité sondy.

Předpokládané uvolňování sondy z gelu nastalo po výměně původního supernatantu po 24 hodinách za roztok SDS. U gelů D1 docházelo k pozvolnému uvolňování sondy do nového roztoku SDS. Až po 17 dnech dosáhla koncentrace nilské červeně v supernatantu téměř původní hodnotu změřenou po 24 hodinách. U systémů gel D2 – 100 mM SDS byla koncentrace sondy ve vyměněném supernatantu u systémů s vyšší původní koncentrací sondy už po 4 dnech několikrát vyšší než v původním supernatantu po 24 hodinách. U nejnižší koncentrace nilské červeně naopak dochází k její absorpci zpět do gelu a u koncentrací sondy 3,5-5 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ se množství sondy v roztoku během následujících dní prakticky nemění.

Nilská červen se u gelů D1, jejichž supernatant byl vyměněn za 0,15 M roztok NaCl, do tohoto roztoku uvolňovala jen málo. U nízkých koncentrací původní sondy 2-6 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ se do 3 dnů po výměně uvolní do roztoku jen malé množství sondy a následující dny se toto množství nemění – ustaví se rovnováha. U vyšších koncentrací (7-15 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) dochází k postupnému uvolňování po celou dobu měření, ale oproti roztoku SDS jen v malém množství. Gely D2 s vyměněným supernatantem za roztok NaCl uvolnily do tohoto roztoku po 4 dnech jen velmi malé množství sondy. Následně však došlo k opětovnému vstřebání sondy zpět do gelu a po 11 dnech se v gelech s nižší koncentrací původní sondy nedalo naměřit žádné množství nilské červeně. Malé množství sondy se po 11 dnech dalo naměřit jen u roztoků s nejvyšší koncentrací sondy 10 a 15 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOLTZENBURG, Sebastian., Michael MASKOS a Oskar NUYKEN. *Polymer chemistry*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2016. ISBN 978-3-662-49277-2.
- [2] NIAOUNAKIS, Michael. *Biopolymers: Applications and Trends*. Oxford: Elsevier, 2015. ISBN 978-0-323-35399-1.
- [3] REBELO, Rita, Margarida FERNANDES a Raul FANGUEIRO. Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review. *Procedia Engineering*. 2017, (200), 236-243. ISSN 1877-7058.
- [4] THARANATHAN, Rudrapatnam N. a Farooqahmed S. KITTUR. Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2003, **43**(1), 61-87. DOI: 10.1080/10408690390826455. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690390826455>
- [5] PAL, Kunal, Allan T. PAULSON a Dérick ROUSSEAU. Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems. *Modern biopolymer science: bridging the divide between fundamental treatise and industrial application*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2009, s. 519-557. ISBN 9780123741950.
- [6] SANTOS, Lúcia F., Ilídio J. CORREIA, A. Sofia SILVA a João F. MANO. Biomaterials for drug delivery patches. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018, **118**, 49-66. DOI: 10.1016/j.ejps.2018.03.020. ISSN 09280987. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098718301350>
- [7] KLEMM, Dieter, Brigitte HEUBLEIN, Hans-Peter FINK a Andreas BOHN. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*. 2005, **44**(22), 3358-3393. DOI: 10.1002/anie.200460587. ISSN 1433-7851. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200460587>
- [8] BOONME, Prapaporn, AMNUAIKIT, CHUSUIT a RAKNAM. Effects of a cellulose mask synthesized by a bacterium on facial skin characteristics and user satisfaction. *Medical Devices: Evidence and Research*. 2011, **4**, 77-81. DOI: 10.2147/MDER.S20935. ISSN 1179-1470. Dostupné také z: <http://www.dovepress.com/effects-of-a-cellulose-mask-synthesized-by-a-bacterium-on-facial-skin--peer-reviewed-article-MDER>
- [9] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2006, **29**(1), 17-25. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. ISSN 0141-5492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>

- [10] LIAO, Yong-Hong, Stuart A. JONES, Ben FORBES, Gary P. MARTIN a Marc B. BROWN. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. *Drug Delivery*. 2008, **12**(6), 327-342. DOI: 10.1080/10717540590952555. ISSN 1071-7544. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717540590952555>
- [11] MOKHTARZADEH, Ahad, Abbas ALIBAKHSHI, Maryam HEJAZI, Yadollah OMIDI a Jafar EZZATI NAZHAD DOLATABADI. Bacterial-derived biopolymers: Advanced natural nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, **82**, 367-384. DOI: 10.1016/j.trac.2016.06.013. ISSN 01659936. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993616301261>
- [12] GARCÍA-OCHOA, F, V.E SANTOS, J.A CASAS a E GÓMEZ. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*. 2000, **18**(7), 549-579. DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00050-1. ISSN 07349750. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975000000501>
- [13] LEE, Chi H., Anuj SINGLA a Yugyung LEE. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001, **221**(1-2), 1-22. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00691-3. ISSN 03785173. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517301006913>
- [14] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers: General aspects and special applications*. 9. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 35-273-0228-X.
- [15] PHILLIPS, Glyn O. a P. A. WILLIAMS. *Handbook of Hydrocolloids (2nd Edition)*. 2nd ed. S.l.: Woodhead Pub, 2009. ISBN 978-184-5694-142.
- [16] NEVES, Nuno M. a Rui L. REIS. *Biomaterials from nature for advanced devices and therapies*. Hoboken, New Jersey: John Wiley, 2016. ISBN 978-111-9178-071.
- [17] De BELDER, A. N. Dextran. *Handbooks from Amersham Biosciences*. Dostupné z: <http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/Protein%20purification%20handbooks/Don't%2move/18116612AA.pdf>
- [18] NAESSENS, Myriam, An CERDOBBEL, Wim SOETAERT a Erick J VANDAMME. Leuconostoc dextranase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2005, **80**(8), 845-860. DOI: 10.1002/jctb.1322. ISSN 0268-2575. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1322>
- [19] RUSSO, Vincenzo, Elisa LIBERATI a Nicola CAZZOLLA. *Glycogen-based cationic polymers*. WO 2013/135471 A1. Uděleno 19. 9. 2013.

- [20] DEAE-Dextran. *PHARMACOSMOS* [online]. [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <https://www.dextran.com/about-dextran/dextran-chemistry/deae-dextran>
- [21] PEPPAS, N. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000, **50**(1), 27-46. DOI: 10.1016/S0939-6411(00)00090-4. ISSN 09396411. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641100000904>
- [22] PAL, Kunal, Allan T. PAULSON a Dérick ROUSSEAU. Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems. *Modern biopolymer science: bridging the divide between fundamental treatise and industrial application*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2009, s. 519-557. ISBN 9780123741950.
- [23] HOARE, Todd R. a Daniel S. KOHANE. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. 2008, **49**(8), 1993-2007. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.01.027. ISSN 00323861. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386108000487>
- [24] CAMPONESCHI, Francesca, Andrea ATREI, Giulia ROCCHIGIANI, Lorenzo MENCUCCINI, Marianna UVA a Rolando BARBUCCI. New Formulations of Polysaccharide-Based Hydrogels for Drug Release and Tissue Engineering. *Gels*. 2015, **1**(1), 3-23. DOI: 10.3390/gels1010003. ISSN 2310-2861. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2310-2861/1/1/3>
- [25] ULLAH, Faheem, Muhammad Bisyrul Hafi OTHMAN, Fatima JAVED, Zulkifli AHMAD a Hazizan Md. AKIL. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2015, **57**, 414-433. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.053. ISSN 09284931. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115302393>
- [26] MODARESIFAR, Khashayar a Howard I. MAIBACH. Plant-Based Hydrogels: Applications in Cosmetics. *Cosmetics & Toiletries* [online]. Allured Business Media, 2018, **133**(1), 30-33 [cit. 2018-04-29]. ISSN 0361-4387. Dostupné z: <http://www.cosmeticsandtoiletries.com/research/chemistry/Plant-Based-Hydrogels-Applications-in-Cosmetics-468336043.html>
- [27] MALIJEVSKÝ, Anatol. *Breviář z fyzikální chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000. ISBN 80-708-0403-3.
- [28] SANTOVENA, A., A. DELGADO, C. MONZÓN, C. EVORA, M. LLABRÉS a J. B. FARINA. Development of a standard method for in vitro evaluation of Triamcinolone and BMP-2 diffusion mechanism from thermosensitive and biocompatible composite hyaluronic acid-pluronic hydrogels. *Journal of Drug Delivery Science and*

Technology [online]. 2017 [cit. 2017-05-10]. ISSN 1773-2247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.04.022>

[29] NOVÁK, Josef. Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz [online]. <http://old.vscht.cz/fch/cz/pomucky/FCH4Mgr.view.pdf> [cit. 2014-12-22].

[30] KLUČÁKOVÁ, Martina a Miloslav PEKAŘ. Physical and chemical kinetics in humic dispersions. GHABBOUR, Elham A. a Geoffrey DAVIES. *Humic substances: molecular details and applications in land and water conservation*. New York: Taylor and Francis, 2005, s. 167-188. ISBN 15-916-9031-5.

[31] NIU, Xiaoyun, Zhiling ZHANG a Yinghui ZHONG. Hydrogel loaded with self-assembled dextran sulfate-doxorubicin complexes as a delivery system for chemotherapy. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, **77**, 888-894. DOI: 10.1016/j.msec.2017.04.013. ISSN 09284931. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117307828>

[32] JALALVANDI, Esmat, Lyall R. HANTON a Stephen C. MORATTI. Preparation of a pH sensitive hydrogel based on dextran and polyhydrazide for release of 5-fluorouracil, an anticancer drug. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018, **44**, 146-152. DOI: 10.1016/j.jddst.2017.12.011. ISSN 17732247. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224717305786>

[33] WANG, Lei, Xin LI, Tianyu SUN, Yung-Hao TSOU, Hong CHEN a Xiaoyang XU. Dual-Functional Dextran-PEG Hydrogel as an Antimicrobial Biomedical Material. *Macromolecular Bioscience*. 2018, **18**(2), 1700325-. DOI: 10.1002/mabi.201700325. ISSN 16165187. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.201700325>

[34] HOQUE, Jiaul a Jayanta HALDAR. Direct Synthesis of Dextran-Based Antibacterial Hydrogels for Extended Release of Biocides and Eradication of Topical Biofilms. *Applied materials &*. 2017, **9**(19), 15975-15985. DOI: 10.1021/acsami.7b03208. ISSN 1944-8244. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.7b03208>

[35] YUCEL FALCO, Cigdem, Peter FALKMAN, Jens RISBO, Marité CÁRDENAS a Bruno MEDRONHO. Chitosan-dextran sulfate hydrogels as a potential carrier for probiotics. *Carbohydrate Polymers*. 2017, **172**, 175-183. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.04.047. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717304368>

- [36] LI, Zhuo, Haiyan LI, Caifen WANG, Jianghui XU, Vikramjeet SINGH, Dawei CHEN a Jiwen ZHANG. Sodium dodecyl sulfate/ β -cyclodextrin vesicles embedded in chitosan gel for insulin delivery with pH-selective release. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2016, **6**(4), 344-351. DOI: 10.1016/j.apsb.2016.03.003. ISSN 22113835. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211383515300769>
- [37] WU, Xilong, Jing HOU, Mingzhong LI, Jiangnan WANG, David L. KAPLAN a Shenzhou LU. Sodium dodecyl sulfate-induced rapid gelation of silk fibroin. *Acta Biomaterialia*. 2012, **8**(6), 2185-2192. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.03.007. ISSN 17427061. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706112000931>

8. SEZNAM ZKRATEK A POUŽITÝCH SYMBOLŮ

8.1. Seznam zkratk

| | |
|-------------|---|
| SDS | dodecylsírán sodný |
| STS | tetradecylsírán sodný |
| DEAE | diethylaminoethyl |
| NR | nile red; nilská červeň |
| D1 | roztok dextransu se 400 mM roztokem SDS |
| D2 | roztok dextransu se 100 mM roztokem SDS |
| D3 | roztok dextransu s 200 mM roztokem STS |
| D4 | roztok dextransu se 150 mM roztokem STS |
| FCS | fluorescenční korelační spektroskopie |
| HA | kyselina hyaluronová |
| PVA | polyvinylalkohol |
| β -CD | β -cyklodextrin |

8.2. Seznam použitých symbolů

| | |
|---------------|--|
| c_0 | původní koncentrace sondy |
| c | koncentrace |
| j | tok sondy |
| a | množství navázané sondy na gram gelu |
| \sqrt{t} | odmocnina času |
| t | čas |
| M_w | molekulová hmotnost |
| P | tlak |
| D | difuzní koeficient |
| ε | poměr koncentrace sondy v gelu a v roztoku |